

# **Biotechnologische Produktion und Modifikation mariner Glycoglycerolipide**

Von der Fakultät für Maschinenbau  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde

einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)  
genehmigte Dissertation

von: Dipl.-Ing. Verena Böschen, geb. Lurtz  
aus: Gardelegen

eingereicht am: 21.09.2006

mündliche Prüfung am: 15.12.2006

Referenten:        Prof. Dr. R. Krull  
                         Prof. Dr. S. Lang



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Lang für die Überlassung des Themas, für die wissenschaftliche Betreuung sowie für die Übernahme des Korreferates. Durch einen großzügigen Freiraum in der Gestaltung dieser Arbeit konnte ich fachübergreifende Forschung durchführen, die neue Einblicke und Erkenntnisse hervorgebracht haben.

Herrn Prof. Dr. R. Krull danke ich für die Übernahme des Korreferates sowie Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Schwedes für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.

Ebenfalls großer Dank gilt Herrn W. Graßl für die gute Zusammenarbeit und Hilfestellung bei technischen Problemen während der Fermentationen im Technikum, was wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. V. Wray von der GBF für die großzügige Hilfe bei der Auswertung der Strukturaufklärung.

Für die freundliche und gute Zusammenarbeit bei „kleineren und größeren“ Problemen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Biotechnologie bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Dipl.-Ing. Sascha Bösch, der mich durch seine Geduld und sein reges Interesse an dieser Arbeit stets motiviert und unterstützt hat, aber auch meinen Eltern, die mir durch ihre vielseitige Unterstützung diesen Ausbildungsweg ermöglicht haben.

## **Kurzfassung: „Biotechnologische Produktion und Modifikation mariner Glycoglycerolipide“**

Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei marine Bakterienisolate hinsichtlich des Wachstums und der Metabolitenproduktion untersucht.

Vom *Microbacterium* spec. DSM 12583 (Mittelmeerisolat) ist aufgrund einer vorausgegangenen Arbeit bekannt, dass es auf Glucose als C-Quelle ein bioaktives Glucosylmannosyl-glycerolipid (GGL.2) bildet. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Medienoptimierung und geeignete Parameterwahl bei den Bioreaktorkultivierungen die maximale Biomasse und die Produktbildung verdoppelt werden. Es wurde eine maximale Biomasse von 14 g/l und 522 mg/l Glycoglycerolipid gebildet. Das Dosieren von komplexen Bestandteilen in kleinen Raten führte zum Erhalt der Biomasse und des gebildeten Produktes über einen längeren Zeitraum. Weiterhin wurde ein Modell zur Biomasse- und Produktbildung sowie dem Substratabbau entwickelt.

Darüber hinaus konnten durch Lipase katalysierte Hydrolyse zwei neue Produkte gewonnen werden, welche noch bessere Eigenschaften in den extern durchgeführten Bioaktivitätstests zeigten (z.B. Test zur Anti-Tumor-Promoting-Aktivität).

Zwei neu aus der Nordsee isolierte Bakterienstämme (Hel 12/1: *Microbacterium*, Hel 12/2: *Micrococcus luteus*) produzierten ebenfalls, jedoch aus der Literatur bekannte, bioaktive Glycoglycerolipide, deren Anreicherung durch Medienoptimierung gesteigert werden konnte. *Micrococcus luteus* produzierte ein Dimannosyl-glycoglycerolipid, welches ebenfalls sehr gute Ergebnisse beim Test zur Anti-Tumor-Promoting-Aktivität lieferte.

## **Abstract: “Biotechnology Production and Modification of Marine Glycoglycerolipids”**

This thesis deals with the growth behavior and metabolite production of three marine bacterial strains.

One of these strains, *Microbacterium* spec. DSM 12583, which was isolated from the Mediterranean Sea, is known to produce a bioactive glucosylmannosyl-glycerolipid (GGL.2) when grown on glucose as sole carbon source. An optimization of media and bioreactor cultivation parameters was performed, which resulted in doubling of growth rate and product formation. Maximum biomass and product concentrations of 14 g/L and 522 mg/L could be achieved, respectively. By dosage of complex medium compounds, biomass and product could be kept stable for a longer period of time. Finally, a model for biomass and product formation as well as substrate consumption could be established.

Furthermore, two new products could be yielded by a lipase-catalyzed hydrolysis, which showed superior properties compared to GGL.2 with respect to bioactivity tests performed by a different working group (e.g. test for anti-tumour promoting activity).

Two new bacterial strains from the North Sea (Hel 12/1: *Microbacterium* spec. and Hel 12/2: *Micrococcus luteus*) could as well be shown to produce bioactive glycoglycerolipids which however were known from literature. By media optimization, their accumulation could be increased. In particular, *Micrococcus luteus* produced a dimannosyl-glycoglycerolipid, which as well was shown to exhibit very good anti-tumour promoting activities.

## **Tagungsbeiträge**

V. Lurtz, I. Kampen, A. El-Ghezal. Metabolitenbildung bei neuartigen marinen Bakterien. GVC/DECHEMA -Jahrestagung, 20. Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, 11. – 13.06.2002 (Poster)

V.Lurtz, C. Wiendahl, S. Lang. Native and modified products from marine bacteria. Kongress “natural products from marine microorganisms”, Greifswald, 19 – 22.06.2002 (Poster)

V. Lurtz, A. El-Ghezal, I. Kampen, S. Nguyen, S. Lang. Bioreactor cultivations of metabolically variable North Sea bacteria. 3<sup>rd</sup> Euroconference on Marine Natural Products, Elmau Castel, 15. – 20.09.2002 (Poster)

V. Lurtz, S. Lang. Einfluss von komplexen Medienbestandteilen auf Kultivierung und Produktbildung eines marinen Bakteriums, GVC/DECHEMA -Jahrestagung, 22. Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, 04. – 06.05.2004 (Poster)

V. Lurtz, S. Lang. Glycoglycerolipid-Bildung mit marinen Bakterien. GVC/DECHEMA-Vortrags- und Diskussionstagung „Systembiotechnologie für industrielle Prozesse“, Braunschweig, 01. – 04.05.2005 (Poster)

## **Publikationen**

O. Langer, V. Lurtz, W. Ramm, S. Lang (2001): Bakterielle Produktion und chemo-enzymatische Modifikation von Glycolipiden. 19. GVC/DECHEMA –Jahrestagung, Tagungshandbuch, S. 221 – 223

O. Langer, V. Lurtz, S. Lang (2001): Biosurfactants from Domestic Vegetable Oils and Their Chemo-Enzymatic Modification. Lipids, Fats and Oils: Reality and Public Perception. 24<sup>th</sup> World Congress and Exhibition of the International Society for Fat Research (ISF), S. 11

V. Lurtz, C. Wiendahl, S. Lang (2002): Native and modified products from marine bacteria. An International Symposium held under auspices of the European Society for Marine Biotechnology, Book of Abstracts, S. 40

W. Ramm, W. Schatton, I. Wagner-Döbler, V. Wray, M. Nimtz, H. Tokuda, F. Enjyo, H. Nishino, W. Beil, R. Heckmann, V. Lurtz, S. Lang (2003). Diglucosyl-glycerolipids from the marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: their production, enzymatic modification and properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, S. 497 – 504

S. Lang, W. Ramm, M. Hüners, V. Lurtz (2004): Zur Bioprozesstechnik mit marinen Bakterien und Pilzen. *BioRegionN*, Book of Abstracts, S. 14

V. Lurtz, S. Lang (2004): Einfluss von komplexen Medienbestandteilen auf Kultivierung und Produktbildung eines marinen Bakteriums, GVC/DECHEMA - Jahrestagung, Tagungshandbuch, S. 510

S. Lang, W. Beil, H. Tokuda, C. Wicke, V. Lurtz (2004): Improved Production of Bioactive Glucosylmannosyl-Glycerolipid by Sponge-Associated *Microbacterium* Species. *Mar. Biotechnol.* 6, S. 152 - 156

S. Lang, M. Hüners, V. Lurtz (2005): Bioprocess Engineering Data on the Cultivation of Marine Prokaryotes and Fungi. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 97, S. 29 – 62

V. Lurtz, S. Lang (2005): Glycoglycerolipid-Bildung mit marinen Bakterien. GVC/DECHEMA-Vortrags- und Diskussionstagung „Systembiotechnologie für industrielle Prozesse“, S. 58

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Marine Biotechnologie</b>	<b>2</b>
1.1.1 Anwendungsbereich Pharmazie	2
1.1.2 Technische Anwendungsbereiche	3
1.1.3 Lebensmittelindustrie und Umweltaspekte	4
<b>1.2. Probleme der marinen Biotechnologie</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Lösungsansätze</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Zusammenfassung</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Ziel dieser Arbeit</b>	<b>10</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Mikroorganismen</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Chemikalien</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Nährmedien</b>	<b>13</b>
2.3.1 Komplexmedium	13
2.3.2 Synthetisches Meerwasser SM1	13
2.3.3 KSW-Medium	14
<b>2.4 Kulturführung</b>	<b>15</b>
2.4.1 Stammhaltung	15
2.4.2 Schüttelkulturen	16
2.4.3 Kultivierung im Bioreaktor	17
<b>2.5 Phylogenetische Charakterisierung</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Charakterisierungsmethoden für Bakterien</b>	<b>20</b>
2.6.1 Morphologische Charakterisierung	20
2.6.2 KOH-Test	21
<b>2.7 Reaktorcharakteristika</b>	<b>21</b>
2.7.1 Energie- und Leistungseintrag	21

<b>2.8 Kultivierungsparameter</b>	<b>22</b>
2.8.1 Optische Dichte	22
2.8.2 Biotrockenmasse	22
2.8.3 Proteingehalt	23
2.8.4 Glycerinkonzentration	23
2.8.5 Ammoniumverbrauch	24
2.8.6 Phosphatkonzentration	24
2.8.7 Bestimmung der Glycoglycerolipid Konzentration	25
2.8.8 Aminosäuren-Bestimmung	26
2.8.9 Ausbeutekoeffizienten	26
2.8.10 Produktbildungsrate	27
2.8.11 Sauerstoffverbrauchsrate, Kohlendioxidbildungsrate und respiratorischer Quotient	27
<b>2.9 Aufbereitung der Biomasse und Produktisolation</b>	<b>28</b>
2.9.1 Anreicherung von Zellmaterial	28
2.9.2 Isolierung der Glycoglycerolipide und des Kohlenstoffgerüsts GG.2	28
2.9.3 Analytische Dünnschichtchromatographie	29
<b>2.10 Chemische Methoden</b>	<b>29</b>
<b>2.11 Untersuchung von biologischen Aktivitäten</b>	<b>30</b>
2.11.1 Agardiffusionstest mariner Bakterienstämme verschiedener phylogenetischer Gruppen	30
2.11.2 In vivo „two-stage mouse skin carcinogenesis“ Test	31
2.11.3 Test zur Anti-Tumor- Promoting-Aktivität	32
<b>2.12 Strukturaufklärung</b>	<b>32</b>
2.12.1 Kernspinresonanzspektroskopie	32
2.12.2 Massenspektrometrie	32
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>3.1 <i>Microbacterium spec.</i> DSM 12583</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung</b>	<b>36</b>
3.2.1. Medienbesonderheiten	37
3.2.2 Ausgangssituation	37
3.2.3 Grundlegende Schüttelkolbenexperimente	39



3.2.4 Experimente zur Medienoptimierung	43
3.2.5 Bestimmung der Phosphatkonzentration	44
3.2.6 Bestimmung der Glycerinkonzentration	45
3.2.7 Überprüfung weiterer Substrate	47
<b>3.3 Bioreaktorkultivierungen zur Medienoptimierung</b>	<b>49</b>
3.3.1 Batch-Kultivierungen	49
3.3.1.1 Ausgangssituation	49
3.3.1.2 Einfluss des Initial pH-Wertes	54
3.3.1.3 Einfluss der zugesetzten Natriumhydrogenphosphatmenge	56
3.3.1.4 Einfluss der Glycerin – Konzentration	58
3.3.1.5 Einfluss des Volumenbezogenen Leistungseintrages	61
3.3.1.6 Repeated Batch-Fermentation	64
3.3.1.7 Kontinuierliche Kultivierung	66
3.3.1.8 Einfluss des Komplexanteils auf die Kultivierung	68
3.3.1.9 Kontinuierliches Zufüttern von konzentrierter Komplex-Lösung	74
<b>3.4 Modellbildung</b>	<b>76</b>
3.4.1 Modellbildung für den Batch-Betrieb	77
<b>3.5 Enzymatische Modifikation des Glycoglycerolipids GGL.2</b>	<b>80</b>
3.5.1. Gewinnung des Glycoglycerin GG.2 durch enzymatische Hydrolyse	80
3.5.2. Versuche zur enzymatischen Acylierung des GG.2	87
<b>3.6 Isolierung und Charakterisierung der Komponente GGL.2a sowie GG.2</b>	<b>90</b>
<b>3.7 Untersuchung auf biologische Aktivitäten der Glycoglycerolipide</b>	<b>92</b>
3.7.1 Test zur Anti-Tumor- Promoting-Aktivität	92
3.7.2 Agardiffusionstest	94
3.7.3 In vivo Test (“two-stage mouse skin carcinogenesis“ Test)	95
<b>3.8 Hel 12/1 und Hel 12/2</b>	<b>98</b>
3.8.1 <i>Microbacterium</i> spec. (Hel 12/1) Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung	98

3.8.2 <i>Microbacterium</i> spec. (Hel 12/1): Bioreaktorkultivierungen zur Anreicherung der Zellmasse	100
3.8.3 <i>Micrococcus luteus</i> (Hel 12/2) Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung	102
3.8.4 <i>Micrococcus luteus</i> (Hel 12/2) Bioreaktorkultivierungen zur Anreicherung der Zellmasse	102
3.9 Isolierung und Charakterisierung der Komponente GGL5	105
<b>4. Diskussion</b>	<b>106</b>
4.1 Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung	106
4.2 Bioreaktorexperimente zur Medienoptimierung	112
4.3 Enzymatische Modifikation des Glycoglycerolipids GGL.2	128
4.3.1 Enzymatische Hydrolyse des GGL.2	129
4.4 Biologische Aktivitäten der Glycoglycerolipide	130
4.5 <i>Microbacterium</i> spec. Hel 12/1 und <i>Micrococcus luteus</i> Hel 12/2	133
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>134</b>
5.1 <i>Microbacterium</i> spec. DSM 12583	134
5.2 <i>Microbacterium</i> spec. (Hel12/1) und <i>Micrococcus luteus</i> (Hel12/2)	136
<b>6. Symbolverzeichnis</b>	
<b>7. Anhang</b>	
<b>Literaturverzeichnis</b>	

## 1. Einleitung

Die Krankheit Tuberkulose und der ursächliche Erreger *Mycobacterium tuberculosis* wurden bereits im Jahre 1882 von R. Koch beschrieben. Heute im 21. Jahrhundert ist die Tuberkulose immer noch die Hauptursache für die weltweit höchste Sterberate [Tripathi et al. 2005, Diel et al. 2005]. Für HIV-positive Menschen spielt die Tuberkulose eine besondere Rolle, da ihr Risiko, an der Tuberkulose zu erkranken, auf Grund ihrer Immunschwäche erhöht ist.

Das *Mycobacterium* ist ein langsam wachsender gram-positiver Organismus, welchen man mit Antibiotika bekämpft. Es hat sich jedoch gezeigt, dass dieser Erreger schnell Resistenzen ausbilden kann. In den letzten Jahren traten immer häufiger multiresistente Stämme auf, gegen welche die herkömmlichen Antibiotika wirkungslos sind. Da die meisten Antibiotika mikrobiellen Ursprungs sind und aus terrestrischen Bakterien der Gruppe der *Actinomyceten* stammen, diese hauptsächlich im Boden vorkommen und daher als leicht zugänglich bereits intensiv studiert wurden, steigt die Wiedererkennungsrates dieser Organismen und damit auch die der aus ihnen isolierten Substanzen [Wicke 1999]. Im Gegensatz zum terrestrischen Areal rückten gerade in den letzten Jahren die marinen Habitate und dadurch die marine Biotechnologie bei der Suche nach neuen Wirkstoffen immer mehr ins Interesse der Wissenschaft. Das Potential, das in den Meeren liegt, ist weitestgehend unbekannt. Rund 70% der Erdoberfläche sind von Meeren bzw. Wasser bedeckt und man nimmt an, dass die Hälfte aller auf der Erde vorhandenen Arten in diesen vorkommt. Die Zahl der marinen Spezies wird zwischen 3 und 500 Millionen geschätzt, von denen heute erst ein kleiner Bruchteil bekannt ist [König et al. 1997]. Das marine Habitat bietet damit eine faszinierende Fülle an einzigartigen Organismen und damit verbunden eine enorm große Biodiversität. Weiterhin sind die Organismen variablen ökophysiologischen Bedingungen ausgesetzt (Salzgehalt, hydrostatischer Druck, Temperatur, Sauerstoffgehalt, usw.), so dass der Stoffwechsel der Meeresorganismen andere Prägungen aufweist und andere Notwendigkeiten im wässrigen Milieu erfüllen muss, als es bei terrestrischen Organismen der Fall ist [Terlau et al. 2000].

## 1.1 Marine Biotechnologie

Durch neue Methoden, z.B. den Vergleich der 16S-ribosomalen RNA werden immer mehr bisher unbekannte mikrobielle Spezies entdeckt. Diese stehen damit als potentielle Naturstoffproduzenten zur Verfügung. Insbesondere Bakterien, Pilze und wirbellose Tiere (z.B. Schwämme, Korallen, Muscheln), haben sich als ergiebige Quelle neuer Naturstoffe erwiesen, die als Wirk- und Werkstoffe für den Menschen von Nutzen sein können [Zeeck et al. 1999]. So enthält z.B. ein Milliliter Seewasser ungefähr eine Million Mikroorganismen, welche größtenteils unbekannt und derzeit unkultivierbar sind [Fenical 2002, Cypionka 2002]. Die Chancen, Substanzen mit wirklich neuen Eigenschaften aus dem Zoo- und Phytoplankton zu gewinnen, sind damit vergleichsweise hoch.

### 1.1.1 Anwendungsbereich Pharmazie

Die Pharmaindustrie hat ein großes Interesse an der Suche nach neuen Wirkstoffen [Terlau et al. 2000]. Vom neu gefundenen Naturstoff bis zur Zulassung eines Pharmazeutikums vergeht viel Zeit, so dass es nicht verwunderlich ist, dass Präparate marinen Ursprungs noch selten auf dem Markt vertreten sind. Es gibt jedoch schon eine Reihe mariner Naturstoffe, welche als potentielle Pharmaka zukünftig in Frage kommen und sich derzeit in der klinischen Prüfung befinden (Tabelle 1.1). Viele dieser Substanzen wurden aus Schwämmen, Korallen, Muscheln oder Manteltierchen, den Invertebraten isoliert. Die meisten von ihnen ernähren sich von Bakterien und Mikroalgen oder kommen in enger Assoziation mit ihnen vor. Dadurch stellt sich die Frage nach den eigentlichen Produzenten der Naturstoffe. Im Fall der Okadainsäure, einem selektiven Hemmstoff von Proteinphosphatasen, konnte die Herkunft klar belegt werden. Zwar wurde die Okadainsäure erstmals aus Schwämmen der Art *Halichondria okadai* isoliert, doch steht heute fest, dass der Dinoflagellat *Prorocentrum lima* der Produzent dieser Verbindung ist, welche im Rahmen der Nahrungskette in den Schwamm gelangt [Procksch et al. 1996].

**Tabelle 1.1:** Ausgewählte Wirkstoffe aus Meeresorganismen

Wirkstoff	Herkunft	Indikation
Aplidine	Manteltier: <i>Aplidium albicans</i>	Antitumor
Conotoxin M-VII-A	Kegelschnecke: <i>Conus magus</i>	Analgetisch
Discodermolid	Schwamm: <i>Discodermia kiiensis</i>	Immunsuppressiv, Zytotoxisch
Dolastin 10	Seehaare: <i>Dolabella auricularia</i>	Antitumor
Ecteinascidin 743	Manteltier: <i>Ecteinascidia turbinata</i>	Antitumor
Eleutherobin	Lederkoralle: <i>Eleutherobia albiflora</i>	Zytotoxisch
Halichondrin B	Schwamm: <i>Halichondria okadai</i>	Antitumor
Halomon	Rotalge: <i>Portieria hornemannii</i>	Zytotoxisch
Kahalide F	Seeschnecke: <i>Elysia rufescens</i>	Antitumor
Manoalid	Schwamm: <i>Luffarellia variabilis</i>	Entzündungshemmend
Microcolin A	Cyanobakterium: <i>Lyngba majuscula</i>	Zytotoxisch
Pseudopterosin B	Koralle: <i>Pseudopterogorgia bipinata</i>	Entzündungshemmend, Analgetisch

### 1.1.2 Technische Anwendungsbereiche

Die marine Biotechnologie beschäftigt sich nicht nur mit der Suche nach neuen Naturstoffen bezüglich der Pharmaindustrie, sondern auch mit weiteren praktischen Anwendungen, z.B. mit dem Schutz vor Epibionten bei Schiffen, Pipelines und Hafenanlagen. Das so genannte „Biofouling“ verursacht große ökonomische Schäden innerhalb der Schiffsindustrie [Dahlström et al. 2003]. Die Standardmethode zur Bekämpfung des Biofouling besteht im Auftragen von Bewuchsschutzfarben. Diese enthielten bis zum Jahre 2003 das Biozid Tributylzinn (TBT), und wurden danach auf Grund der starken Umweltschädlichkeit durch andere Biozide ersetzt. In vielen Fällen werden dabei jedoch immer noch Kupfer- und Zinnverbindungen eingesetzt.

Da der Bewuchs biologischen Ursprungs ist, liegt es nahe, dass die Entwicklung biologischer Abwehrmechanismen eine ertragreiche Fundgrube für biologische Studien und technische Bewuchsschutzstrategien ist [Baum et al. 2004]. So zeigt

z.B. die Rotalge *Laurencia rigida* in den frühen Phasen ihres Lebenszyklus eine von Epibionten freie Oberfläche. Aus dem Extrakt dieser Alge konnten mehrere terpenoide Naturstoffe mit hoher Toxizität isoliert werden. Da in der Praxis nur das Ansiedeln verhindert und nicht der gesamte Organismus geschädigt werden soll, gab es in diesem Fall keine Anwendungsmöglichkeiten. Vielversprechender war die Rotalge *Delisea pulchra*. Sie produziert einige bromierte und iodierte Furanone. Die beobachtete Wirkung auf die Epibionten scheint nicht auf eine generelle Toxizität der Substanzen zurückzugehen, sondern vielmehr wird vermutet, dass diese Verbindungen als chemische Signale (Allomone) wirken, welche nur das Ansiedeln der unerwünschten Organismen verhindert. Das Anwendungspotential dieser Algenmetabolite wurde von einer australischen Arbeitsgruppe inzwischen patentiert (PCT/AU95/00407 1994) [König et al. 1997] und die ersten Freiversuche fanden statt. Mit der Erforschung dieser Metabolite wurde erkannt, dass Furanone die Bindungsstelle für Signalstoffe in den Zellen blockieren. Auf diese Weise wird bei Bakterien die Sekretierung von Toxinen unterbunden, was letztlich die Ausbildung von Krankheiten verhindert [Parsek et al. 2004, Hentzer et al. 2003].

### 1.1.3 Lebensmittelindustrie und Umweltaspekte

Ein weiterer Anwendungsschwerpunkt der marinen Biotechnologie kann in der Produktion von neuen Enzymen liegen. Für nahezu jede chemische Stoffumwandlung lässt sich ein geeignetes Enzym finden, das potentiell in der Lage ist, einen klassischen chemisch-physikalischen Prozess durch ein biochemisches bzw. biotechnologisches Verfahren zu ersetzen bzw. dieses zu optimieren. Enzyme sind damit wichtige Werkzeuge der Biotechnologie, deren produktionsintegrierter Einsatz vielfach zu einer besseren Ausnutzung von Rohstoffen, einer Verringerung von Schadstoffemissionen und einer Herabsetzung des Energieverbrauchs führt.

Enzyme marinen Ursprungs bieten besondere Vorteile für den industriellen Gebrauch. Die optimale Aktivität dieser Katalysatoren liegt z.B. im Bereich höherer Salzkonzentrationen (halophil), was den Einsatz in raueren Milieubedingungen möglich macht. Zusätzlich sind viele dieser Enzyme thermotolerant und letztlich über einen langen Zeitraum bei Raumtemperatur stabil [Mohapatra et al. 2003]. 80 Prozent des Meerwassers hat eine Temperatur von unter fünf Grad Celsius, d.h. die Lebewesen und damit ihre Enzyme sind kälteangepasst, eine Eigenschaft, die nicht nur in der Lebensmittelindustrie große Bedeutung hätte. Ausgangsstoffe müssten

nicht mehr so stark erhitzt werden (Pasteurisieren, Sterilisieren) und trotzdem würde das Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen verhindert und gleichzeitig Energiekosten eingespart. Ähnliches gilt für den Bereich der Waschmittelindustrie (Tenside).

Mit der mikrobiellen Herstellungsweise von Tensiden ist eine Alternative zur chemischen Synthese gegeben, mit deren Hilfe die klassischen Tenside durch umweltfreundlichere Produkte verdrängt werden können [Lang et al. 2002]. Zu den Hauptklassen der Biotenside zählen niedermolekulare Glycolipide und Lipopeptide. Von Glycoglycerolipiden, einer Untergruppe der Glycolipide, wurde auch im Zusammenhang mit verschiedenen marinen Organismen berichtet. So produziert z.B. die im Mittelmeer beheimatete Grünalge *Caulerpa taxifolia* mehrere Galactosylglycoglycerolipide [Manicini et al. 1998] und verschiedene Cyanobakterien Mono- und Digalactosyldiacylglycerine [Falch et al. 1995, Murakami et al. 1991].

Neben den Bakterien und deren produzierten Enzymen sind gerade in der Lebensmittelindustrie die Algen von Interesse. Mikroalgen speziell aus dem marinen Bereich haben ein großes biotechnologisches Potential. Sie produzieren verschiedene Substanzen für Futter- und Lebensmittel, Pharma- und Kosmetikartikel. Sie sind reich an Protein,  $\beta$ -Carotenoiden, Vitaminen und Mineralien. Das  $\beta$ -Carotin oder Vitamin A wird zum Beispiel von der Mikroalge *Dunaliella salina* produziert, welche allgemein die Hauptquelle für natürliches  $\beta$ -Carotin ist [Hejazi et al. 2003].

Das Schonen der Ressourcen und der Bedarf an erneuerbaren Energiequellen ist ein weiterer Schwerpunkt, welcher kurz erwähnt werden soll. Das Cyanobakterium *Synechococcus* sp. produziert z.B. Wasserstoff beim Abbau von organischem Material in Abwässern. Neben den Bakterien könnten Mikroalgen zukünftig als Energielieferant in Frage kommen, da verschiedene Grünalgen unter anaeroben Bedingungen ebenfalls Wasserstoff produzieren. Der Prozess wird über das Enzym Hydrogenase und durch Energie aus der Photosynthese gesteuert und verläuft bisher jedoch mit einer sehr geringen Ausbeute. Im marinen Habitat sind extreme Umweltnischen wie die Tiefsee oder heiße Quellen „black smoker“ (400°C) von besonderem Interesse. Enzyme dieser dort isolierten extremophilen Mikroorganismen zeichnen sich besonders durch eine hohe Stabilität gegenüber

Chelatbildnern, Detergenzien und denaturierenden Reagenzien aus [Antranikian 2004]. Es eröffnen sich neue Anwendungsbereiche für den Einsatz des gesamten Organismus oder deren Katalysatoren z.B. mit der biotechnologischen Verwertung von Abfallfeldern und salzbeladenen Abwässern.

Die Umsetzung verschiedener Ausgangsprodukte, welche oft nur bei hohem Druck und unter Verwendung von Säuren oder Laugen abläuft, könnte umweltfreundlicher durch Enzyme ersetzt werden.

Durch den kontinuierlichen Mangel an mineralischen Ressourcen und den steigenden Verbrauch an wertvollen Metallen weltweit, wird die Entwicklung umweltfreundlicher Techniken zur Erschließung alternativer Ressourcen von Metallen benötigt. Eine dieser Technologien ist der Einsatz der Biotechnologie zur Rückgewinnung von Metallen wie Kupfer, Nickel und Cobalt aus Seegurken [Mukherjee et al. 2004].

## 1.2. Probleme der marinen Biotechnologie

Leider hat man im Arbeitsfeld der marinen Biotechnologie auch mit diversen Problemen zu kämpfen. Z.B. gibt es eine vergleichsweise aufwendige Beschaffung des Materials (Schwämme, Korallen, Schnecken usw.), welches in seiner Menge begrenzt ist. Zur Isolierung von nur einem Gramm des Metaboliten Ecteinascidin 743 würde beispielsweise eine Tonne des Manteltierchens *Ecteinascidia turbinata* benötigt [Lindel 1998]. Ein weiteres Beispiel dafür ist das Halichondrin B. Die Struktur des Halichondrin B wurde 1986 von Hirata und Uemura beschrieben, welche für 12,5 mg dieser Substanz 600 kg des Schwammes *Halichondria okadai* sammeln mussten [König et al. 1997]. In diesem Zusammenhang sind aber nicht nur die Probenmengen, sondern auch die Qualität der Proben selbst ein wichtiger Faktor, da diese nicht immer eine verlässliche Stoffquelle darstellen. Dieses Phänomen lässt sich gut am Halomon erklären. Halomon ist eine vielversprechende Antitumor-substanz (Tabelle 1.1). Sie wird aus der feingliedrigen Rotalge *Portieria hornemannii* gewonnen. Für eine Substanzmenge von 430 mg sind 2 bis 4 kg Nassgewicht dieser Alge notwendig. Die Alge wurde jedoch nicht nur bei den Philippinen sondern auch an anderen Standorten gewonnen. Auf diese Weise ließen sich auch unter-



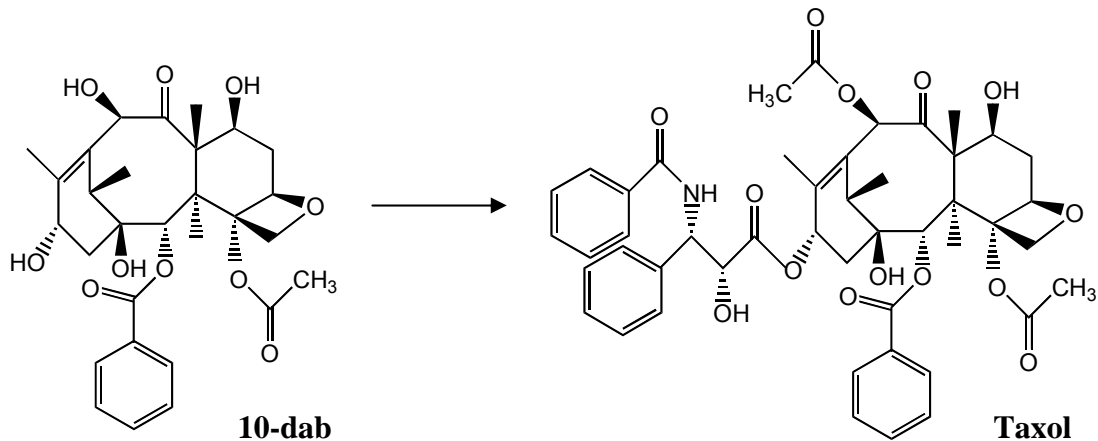
schiedliche Variationen des Sekundärstoffes nachweisen. Selbst wenn man die Proben eines Standortes vergleicht, stellt man fest, dass bereits während des Zeitraums von einem Monat in einer einzigen Population Änderungen im Halomongehalt bis hin zum vollständigen Fehlen des Halomon auftreten können. Diese Beobachtung bestätigt, dass Populationen am natürlichen Standort nicht als verlässliche Naturstoffquelle anzusehen sind [König et al. 1997]. In solchen Fällen ist klar, dass der Wirkstoff kein späteres Arzneimittel werden kann, wenn die Substanzbeschaffung nicht realisiert wird.

### 1.3 Lösungsansätze

Gerade in Bezug auf die Substanzbeschaffung bietet die Biotechnologie (Aquakulturtechnik, Zellkulturforschung, Fermentationstechnik, rekombinante Herstellung mariner Naturstoffe) eine Menge an Lösungsansätzen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Das bekannteste Beispiel für die Semisynthese eines marinen Metaboliten ist Taxol. Die Verbindung wurde ursprünglich aus der Rinde des im Pazifik auftretenden *Taxus brevifolia* isoliert und ist nach seiner Semisynthese das vielversprechendste Antitumormittel der letzten 30 Jahre.

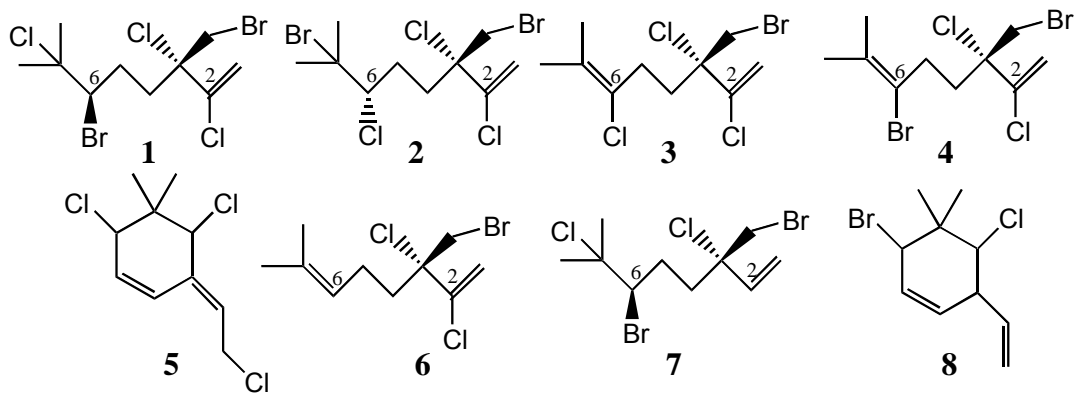
Die erste Gesamtsynthese des Taxols wurde 1994 von Holton beschrieben. Hierzu waren 40 Syntheseschritte notwendig, wobei die Ausbeute sehr gering war. Vielversprechender war die Aussicht, das natürlich vorkommende Taxan als Leitstruktur zu nutzen und chemisch in Taxol umzuwandeln (Abbildung 1.1). Die Umwandlung von 10-deacetyl baccatin III (10-dab) in Taxol gelang 1991 in 4 Schritten und wurde von der Gruppe Holton patentiert [Gueritte-Voegelein 1986, Lesney 2004].



**Abbildung 1.1:** Umwandlung von Taxan (10-dab) zu Taxol

Ähnliches kann man über das Syntheseprodukt des Peptides M-VII-A sagen. Es wurde aus der Kegelschnecke *Conus magus* isoliert (Tabelle 1.1) und hatte hervorragende schmerzlindernde Eigenschaften. Durch chemische Synthese konnte dieser Metabolit reproduziert und als Ziconotid bereits in der klinischen Phase getestet werden.

Doch gerade in der chemischen Synthese liegen erhebliche Probleme, da nicht bekannt ist, welche strukturellen Voraussetzungen für die biologischen Wirkungen notwendig sind und welche funktionellen Gruppen eine entscheidende Rolle spielen. Durch den Vergleich der strukturellen Varianten der Metabolite, welche die natürlichen Produzenten auf Grund verschiedener Standorte haben, kann man darüber Aufschluss erlangen. Zum Beispiel wurden vom Halomon unterschiedliche strukturverwandte halogenierte Monoterpene mit variierenden Eigenschaften isoliert. Durch den Vergleich dieser zeigte sich, dass eine Substitution von C-6 und C-2 mit Halogenatomen essentiell für die Aktivität dieser Verbindung ist (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** Strukturverwandte des Halomons (Verbindungen 1-4 ähnliches Zytotoxizitätsprofil, 5 und 8 weit weniger toxisch, 6 und 7 keine vergleichbare Aktivität)

Wesentlich günstiger könnte es sein, marine Naturstoffe rekombinant durch Fermentation in ausreichender Menge herzustellen. Dies ist z.B. beim Protein Cyanovirin-N gelungen, das ursprünglich aus dem Cyanobakterium *Nostoc ellipsosporum* isoliert wurde. Nanomolare Konzentrationen des Proteins reichen aus, damit der AIDS-Erreger HIV-1 seine infektiöse Wirkung vollständig verliert [Lindel 1998].

Ein nicht zu vergessender Punkt in diesem Bereich ist letztlich die Aquakultur. Gerade Schwämme sind als Quelle zahlreicher biologisch aktiver Substanzen bekannt geworden [Hausmann 2003]. Für eine nachhaltige Nutzung des marinen Inventars ist es daher erforderlich, Schwammmaterial durch Aquakulturen in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. Um in diesem Fall ein Beispiel zu nennen, kann auf den Halichondrin-Produzenten *Lissodendoryx* sp. verwiesen werden. Dieser Schwamm wird in relativ flachem Wasser kultiviert und dessen Volumen ließ sich in zwei Monaten auf das 50fache steigern.

## 1.4 Zusammenfassung

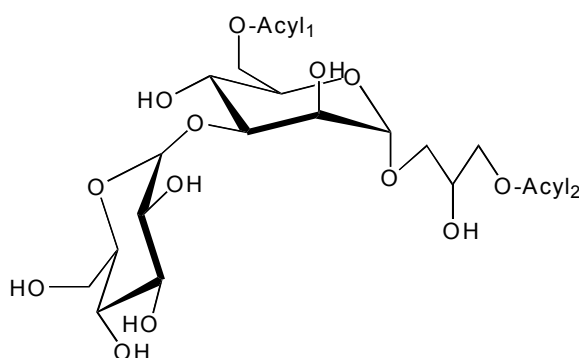
Die marine Biotechnologie ist ein sehr junger Forschungsbereich und kann in die Grundlagenforschung eingeordnet werden. Diese ist unerlässlich für das Verständnis von vielen Abläufen und Prozessen in der Natur. Neue Naturstoffe, die bisher nicht

Ziele der Synthese waren, verfügen über Strukturelemente, welche sich ein Chemiker niemals ohne das Vorbild der Natur ausgedacht hätte. Es gibt somit unverändert ein großes Innovationspotential bei der Nutzung von Naturstoffen als Leitstrukturen [Terlau et al. 2000]. In vielen Fällen sind die molekularen Mechanismen, auf welche die Wirkung der Substanzen zurückzuführen ist, noch nicht verstanden.

Da man unter dem Begriff „Bioprospecting“ die Suche nach neuen chemischen Strukturen mit anwendungsrelevanten biologischen Eigenschaften aus natürlichen Quellen versteht, ist es wichtig, von der Natur zu lernen, um das Wissen von der Struktur neuer Metabolite, deren Eigenschaften und Wirkungsmechanismen auf für uns nützliche Prozesse zu übertragen.

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Im August 1995 wurde aus dem Schwamm *Halichondria panicea* das marine Bakterium *Microbacterium* spec. DSM 12583 isoliert [Wicke et al. 2000]. Es handelte sich bei diesem Stamm um eine neue Art, welche im Rahmen einer Diplom- und Doktorarbeit hinsichtlich des Wachstums und der Naturstoffbildung untersucht wurde. Aus den organischen Rohextrakten von Zellen und Kulturüberstand konnten einige Metabolite des Bakteriums, unter anderem das dargestellte Glycoglycerolipid (Abbildung 1.3), isoliert werden.



**Abbildung 1.3:** Glucopyranosyl(1 $\alpha$ -3)-6-acylmannopyranosyl(1 $\alpha$ -1)-3-acylglycerol

Ein Test des Glycoglycerolipides und seiner durch Verseifung hergestellten hydrolytischen Form (Zucker-Glyceringerüst ohne Fettsäuren) ergab positive Resultate auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch TPA

(12-O-Tetradekanoylphorbol-13-acetat) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (Epstein-Barr-virus early antigen EBV-EA) [Wicke 1999]. Da dieser Test als sehr Erfolg versprechend einzuordnen war, wurde geplant, in Kooperation mit Dr. H. Tokuda der Kyoto Prefectural University of Medicine mit den selben Substanzen weitere Experimente durchzuführen.

Die vor einigen Jahren durchgeführte Diplom- und Doktorarbeit in der hauptsächlich Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung durchgeführt wurden, bildete die Grundlage für diese Arbeit. Um die Ausbeute an Glycoglycerolipid zu steigern, sollte in dieser Arbeit verstärkt auf verschiedene Prozessparameter wie pH-Wert, Substrat- und Sauerstoffkonzentration im Bioreaktor, sowie unterschiedliche Prozessführungen (Batch, Fed-batch, kontinuierliche Kulturführung) beobachtet werden.

Weiterhin wurden im Rahmen des Niedersächsischen Forschungsbereiches „Meeresbiotechnologie“ zwei neue Stämme aus der Nordsee untersucht, um auch bei diesen Wachstumsparmeter zu ermitteln und die Metabolitenproduktion zu beobachten. Die Vorgehensweise in beiden Fällen ist ähnlich, unterscheidet sich jedoch in einigen Punkten (Abbildung 3.1 und 3.2).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Mikroorganismen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen handelt es sich um ein Eigenisolat (*Microbacterium* spec. DSM 12583), welches innerhalb der Arbeitsgruppe\* in Verbindung mit dem Schwamm *Halichondria panicea*, aus dem Limski-Kanal der kroatischen Adriaküste geerntet wurde und um zwei Isolate von der Nordseeküste (Hel 12/1 und Hel 12/2) .

Die Zuordnung zum *Microbacterium* spec. DSM 12583 erfolgte aufgrund der 16S rRNA-Analyse. Der nächste Verwandte mit einer Übereinstimmung von 97,7 % wäre das *Aureobacterium luteolum*. Organismen dieser Gattung gehören zu den coryneformen Bakterien, welche ein gram-positives, aerobes Verhalten aufweisen, sowie ein pleomorphes Wachstum und Eigenbeweglichkeit zeigen.

Das Nordseebakterium Hel 12/1 konnte mittels der 16S rRNA-Analyse zu 99,7 % ebenfalls der Gattung *Microbacterium* spec. zugeordnet werden (Sequenz: Anhang 7.1). Der Stamm Hel 12/2 hat 99% Ähnlichkeit zu *Micrococcus luteus*, welches ebenfalls ein gram-positives Bakterium ist (Sequenz: Anhang 7.2).

### 2.2 Chemikalien

Es wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Aldrich-Chemie GmbH & Co. KG/Steinheim, Fluka Feinchemikalien GmbH/Neu Ulm, Merck/Darmstadt sowie Sigma Chemical Company/USA eingesetzt, weiterhin:

Bacto Agar	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Hefeextrakt	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Bacto Pepton	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Bacto Marine Broth	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz	Merk/Darmstadt
Glycerin-Test	R-Biopharm, Darmstadt
BBL <sup>®</sup> Enterotube <sup>™</sup> II	Becton Dickinson Europe, Meylan/Frankreich

\* TU Braunschweig, Institut für Biochemie und Biotechnologie, AG Lang

Die verwendeten Lösemittel wurden von den Firmen Riedel de Haen/Seelze und Roth/Karlsruhe bezogen.

## 2.3 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden 20 min bei 121°C mit den zusätzlichen C-Quellen wie Glycerin und Glucose autoklaviert.

Sollten feste Nährmedien zum Einsatz kommen, so wurde Agar Agar in einer Konzentration von 15 g/l hinzugesetzt.

### 2.3.1 Komplexmedium:

Marine Broth (MB)

Eingesetzte Konzentration: 37,40 g/l

pH-Wert: 7,0-7,5

Das Nährmedium wurde 20 Minuten bei 121 °C mit den benötigten Zusätzen wie Glycerin autoklaviert.

### 2.3.2 Synthetisches Meerwasser SM1 [Passeri et al., 1992]

Mineralsalze:

NaCl 23,00 g/l

KCl 0,75 g/l

CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1,47 g/l

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5,08 g/l

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6,16 g/l

Zusätze:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,89 g/l

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,03 g/l

NH<sub>4</sub>Cl 5,00 g/l

Hefeextrakt 3,50 g/l

Bacto Pepton 3,50 g/l

C-Quelle 20,00 g/l

SM1-Reduziert: ohne Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O und NH<sub>4</sub>Cl

Der pH-Wert des Mediums wurde im Schüttelkolben auf 7,5 eingestellt.

### 2.3.3 KSW-Medium (Künstliches Seewasser)

Bacto Pepton	10	g
Hefe-Extrakt	5	g
NaCl	10	g
Leitungswasser	500	ml
Künstliches Seewasser	500	ml

#### Künstliches Seewasser (KSW)

Eisencitrat	0,10	g
NaCl	19,45	g
MgCl <sub>2</sub> •6 H <sub>2</sub> O	8,80	g
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	1,80	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,00	mg
SiO <sub>2</sub>	15,00	mg
Spurenelementlösung	1,00	ml
Strontiumchloridlsg.	1,00	ml
Stammlösung	10,00	ml
Natriumsulfatlösung	400,00	ml
dest. Wasser	588,00	ml

#### Spurenelementlösung (Nach Hoagland 1933):

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	611	mg
MnCl <sub>2</sub>	389	mg
CuSO <sub>4</sub>	56	mg
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	56	mg
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> •18H <sub>2</sub> O	56	mg
NiSO <sub>4</sub> •6H <sub>2</sub> O	56	mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •H <sub>2</sub> O	56	mg
TiO <sub>2</sub>	56	mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> •4H <sub>2</sub> O	56	mg
LiCl	28	mg



---

SnCl <sub>2</sub>	28	mg
KI	28	mg
dest. Wasser	1000	ml

**Stammlösung:**

KCl	5,5	g
NaHCO <sub>3</sub>	1,6	g
KBr	0,8	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	220,0	mg
NaF	24,0	mg
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,0	mg
dest. Wasser	100,0	ml

**Strontiumchloridlösung:**

SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3,4	g
dest. H <sub>2</sub> O	100,0	ml

**Natriumsulfatlösung:**

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,24	g
dest. Wasser	400,00	ml

## 2.4 Kulturführung

### 2.4.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden die einzelnen Kulturen alle 8 Wochen mit der Impföse auf eine Marine Broth Agar-Platte überimpft, bei 27 °C für 72 Stunden inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Stammhaltung des Organismus über einen längeren Zeitraum wurden zusätzlich Stickstoffkonserven angelegt.

**Stickstoffkonserve**

Eine frisch beimpfte und gut bewachsene Platte wurde mit 5 ml Lagermedium aufgeschlämmt. Von dieser Suspension wurden je 1,5 ml in Plastikampullen

pipettiert, bei -70 °C 2 Stunden vorgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert.

### **Lagermedium**

Magermilchpulver	10	g
dest. Wasser	40	ml
Glycerin	12,6	g (entspricht 10 ml)
dest Wasser	auf 100 ml auffüllen und gut suspendieren	

Anschließend sterilisieren

### **2.4.2 Schüttelkulturen**

Die Schüttelkolbenkultivierungen wurden alle in Doppelansätzen und 2 l Kolben mit Schikanen durchgeführt. Diese wurden jeweils mit 500 ml Nährmedium beschickt und mit 5 ml Vorkultur beimpft. Es folgte eine Inkubation bei 30 oder 27 °C (je nach Bakterium verschieden) und 100 min<sup>-1</sup> auf einer Rotationsschüttelmaschine der Firma Braun Biotech International GmbH/ Melsungen.

Die Vorkultur wurde über eine Impföse von der Agar-Platte in 250 ml des gleichen Mediums in 1 l Schüttelkolben unter sonst gleichen Bedingungen angezogen.

Die Länge der Inkubation richtete sich nach dem Wachstumsverlauf der Kulturen, der anhand der Optischen Dichte und des pH-Wertes verfolgt wurde. Der Kultivierungsabbruch erfolgte nach dem Übergang in die stationäre Phase. Anschließend wurde die gesamte Kulturbrühe in einer Variofuge (Heraeus Christ/Osterode) bei 10.000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und sowohl Zellmasse als auch Kulturüberstand für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Naturstoffbildung gelagert.

### **Anzucht der Vorkultur für den Bioreaktor**

Die Vorkulturen für den Bioreaktor wurden auf den jeweiligen Medien im 500 ml Maßstab angesetzt und bei entsprechender Temperatur (30 °C oder 27 °C), 72 Stunden inkubiert. Von dieser Kultur ausgehend wurden 2 l Schüttelkolben beimpft, deren Volumen 5 % des Reaktorvolumens entsprach. Nach einer Inkubationszeit von 48-72 Stunden entsprach die optische Dichte den Anforderungen (OD ≈ 20) und wurde als Inokulum im Bioreaktor eingesetzt.

### **2.4.3 Kultivierung im Bioreaktor**

Die Bioreaktorkultivierung der in dieser Arbeit untersuchten Bakterien wurden in verschiedenen Bioreaktoren der Firma Braun Biotech International GmbH/Melsungen durchgeführt:

- » 10 l Bioreaktor mit Blattrührsystem
- » 10 l Bioreaktor mit Umwurfsystem
- » 40 l Bioreaktor mit Blattrührsystem
- » 50 l Bioreaktor mit Blattrührsystem

### **Meß- und Regeleinheiten**

- » Drehzahlregler mit automatischer Registrierung
- » Drucküberlagerte, sterilisierbare pH-Elektrode mit Grenzwertschalter und Automatischer Registrierung
- » Säure- und Laugezudosage
- » Kühler und Dampffalle für die Abluft
- » On-line Abgasanalyse mit Oxygor 6N für die Sauerstoffanalyse und Unor 6N für die Kohlenstoffdioxidanalyse sowie x-t-Schreiber
- » Schuhmacher-Sterilfilter und regelbares Rotameter für die Zuluft
- » Sterilisierbare, polarographische Sauerstoffelektrode (Ingold AG/Zürich) mit Verstärker und On-line Registrierung
- » Automatische Probennahme mit eigener Regelung
- » Temperaturregelkreis mit Thermofühler PT 100 und Thermostat mit Kühlwasserkreislauf

### **Batch-Kultivierung**

Werden Bakterien in eine Nährlösung eingepflegt, so wachsen sie im Allgemeinen nur so lange, bis ein Faktor ihr Wachstum begrenzt (limitierender Faktor) [Schlegel 1992].

Neben der Zellzahl, welche experimentell recht schwierig zu bestimmen ist, wird im Allgemeinen die Biotrockenmasse als Prozessgröße über die Zeit aufgetragen. Mit Hilfe dieser kann graphisch und auch mathematisch die maximale spezifische Wachstumsrate bestimmt werden [Römpf 1992].

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Über die spezifische Wachstumsrate lassen sich die Zustände der einzelnen Wachstumsphasen definieren.

In der exponentiellen Wachstumsphase nimmt die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  über den gesamten exponentiellen Bereich einen konstanten Wert an. Der Anstieg der Wachstumskurve ist eine Funktion der Nährstoffaufnahme. Mit steigender Nährstoffkonzentration  $S$ , steigt der Wert für die spezifische Wachstumsrate. Bei hohen Nährstoffkonzentrationen ist sie von dieser unabhängig, da eine Substratsättigung vorliegt (Monod-Kinetik).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$K_s$  entspricht der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale spezifische Wachstumsrate erreicht wird.

### **Fed-Batch Kultivierung**

Die Fed-Batch Kultivierung ist eine spezielle Art der Fermentation bei der dem Batch-Fermenter kontinuierlich Nährlösung zugefüttert oder Anteile dieser zu der wachsenden Kultur zugesetzt werden. Dem Fermenter selbst wird entgegen der kontinuierlichen Kultivierung kein Kulturvolumen entnommen. Auf diese Weise kann man verschiedene Wachstumsparameter überprüfen und gegebenenfalls die Zelldichte erhöhen.

### **Kontinuierliche Kultivierung**

Im Gegensatz zur Batch-Kultivierung (geschlossenes System) wird bei der kontinuierlichen Kultivierung ständig frische Nährlösung zugeführt und im gleichen Maße aus dem Fermenter abgezogen (offenes System). Das bietet den Vorteil von physiologischen Untersuchungen, da sich die Zellen konstant unter gleichen Milieubedingungen halten lassen. Zusätzlich gibt es den Vorteil einer hohen Produktivität bei gleich bleibender Produktqualität. Aus der Zuflussrate  $\dot{V}$  und dem Reaktorvolumen  $V_R$  kann man die Durchflussrate  $D$  ableiten:

$$D = \frac{\dot{V}}{V_R} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Im Reaktor wächst nicht nur Biomasse kontinuierlich nach, sondern wird auch mit der gleichen Rate aus dem System entfernt. Im Gleichgewichtszustand, der sich nach 4-5fachem Volumenaustausch durch frisch zulaufendes Medium einstellen kann, gilt für die Änderung der Biomasse folgende Annahme:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \Rightarrow \mu \cdot X = D \cdot X \Rightarrow \mu = D \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Daraus ergibt sich, dass die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  im Gleichgewichtszustand gleich der eingestellten Durchflussrate  $D$  ist.

Obwohl auf Grund des Regelprinzipes verschiedene Arten der kontinuierlichen Kulturführung unterschieden werden können, soll an dieser Stelle nur auf den kontinuierlichen Rührreaktor (CSTR), als Chemostaten, eingegangen werden.

### Chemostat

Bei einem Chemostat wird die Durchflussrate  $D$  konstant gehalten, d.h. durch die Zugabe von Chemikalien in definierter (limitiert) Menge pro Zeiteinheit wird das Wachstumsverhalten durch Nährstofflimitation begrenzt. Die Mikroorganismen befinden sich im Gleichgewichtszustand. Dieser wurde durch eine Substratlimitierung in der Übergangsphase zwischen der exponentiellen- und der stationären Phase hervorgerufen. Bedingt durch die Vorgabe eines Substrates in wachstums-limitierender Konzentration strebt der Chemostat selbständig einem stabilen Zustand entgegen. Ist die Durchflussrate höher oder gleich der spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  gewählt worden, kommt es zum Auswaschen der Zellen. Wird die Gleichung 2.2 (Voraussetzung  $S=K_S$ ) zu Grunde gelegt, tritt ein Auswascheffekt bei  $D < \mu_{\max}$  auf. Die maximale zulässige Durchflussrate  $D_{\text{krit}}$  wird demnach erreicht, wenn die Biomasse im Gleichgewicht gerade den Wert Null erreicht.

Da  $K_S$  oft wesentlich kleiner ist, als die Konzentration des limitierenden Substrates an der Zulaufstelle  $S_0$ , gilt näherungsweise:

$$D_{\text{krit}} \equiv \mu_{\max} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

## 2.5 Phylogenetische Charakterisierung

### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion handelt es sich um eine *in vitro* Amplifikation einer spezifischen DNA-Region in der die Abläufe der zellulären *in vivo* DNA-Replikation nachgeahmt werden. Für phylogenetische Studien zur Ermittlung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Prokaryonten werden Sequenzvergleiche der ribosomalen RNA verwendet [Rehm, Hammer 2001]. Dabei wird das 16S rRNA Gen amplifiziert und anschließend nach der Sanger-Methode sequenziert. Das Molekül besteht aus 1.500 Nukleotiden, welche Regionen mit einer sehr hohen Homologie aufweisen, aber auch Sequenzabschnitten mit starker Variabilität. Diese Bereiche sind für Sequenz-vergleiche interessant und werden zur Ermittlung der Verwandtschaftsbeziehungen herangezogen.

## 2.6 Charakterisierungsmethoden für Bakterien

### 2.6.1 Morphologische Charakterisierung

Zur Unterscheidung von Bakterien werden nach der Isolierung des Organismus zuerst Kenntnisse über die mikroskopische und makroskopische Form gewonnen. Beobachtungen zu Bakterienformen, Bildung von Sporen und der Beweglichkeit der Zellen wurden mit dem Mikroskop (Zeiss Axioskop, Jürgens) bei 100facher Vergrößerung gemacht.

Bei der makroskopischen Unterscheidung handelt es sich um die Differenzierung der verschiedenen Kolonien auf festen Nährböden nach Form, Höhe und Randausbildung.

## 2.6.2 KOH-Test

Mit dem KOH-Test werden die Lipopolysacharide aus der Bakterienzellwand gelöst. Diese ist bei gram-positiven und gram-negativen Organismen verschieden.

Mit einer Impföse wird ein Tropfen 3 %ige KOH-Lösung und Bakterienmasse auf einen Objektträger überführt und verrieben. Sind zähe klebrige Lippopolysaccharidfäden beim Hochziehen der Impfnadel erkennbar, handelt es sich um ein gram-negatives Bakterium. Unterbleibt das Ausbilden dieser Fäden, handelt es sich um gram-positive Keime.

## 2.7 Reaktorcharakteristika

### 2.7.1 Energie- und Leistungseintrag

Eine zentrale Betriebs- und Auslegungsgröße findet man im spezifischen Leistungseintrag wieder. Die Leistung wird nicht nur für die Durchmischung, sondern auch für die Belüftung benötigt. Ein erheblicher Teil wird in Wärme umgewandelt und muss entsprechend abgeführt werden. Die Kultivierungen wurden bei konstanten Temperaturen durchgeführt (isotherm), dementsprechend gilt der erste Hauptsatz der Thermodynamik. Die Rührleistung  $P$ , welche zur Erzeugung eines dreidimensionalen Strömungsfeldes im Rührreaktor notwendig ist, lässt sich aus der Leistungskennzahl bzw. Newtonzahl berechnen.

$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 d^5} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Bei gegebener Geometrie gilt die formale Abhängigkeit:  $Ne = f(Re, Fr, Q)$

Im Folgenden wird nur auf das System niedriger Viskosität eingegangen. In wasserähnlichen, begasten Fluiden ist mit zunehmender Gasbelastung eine Abnahme der eingetragenen Rührleistung zu beobachten, unabhängig von den eingesetzten Rührertypen. Diese wird durch Gaspolster verursacht, die sich hinter den Rührerblättern ausbilden. Auf diese Weise wird der Strömungswiderstand des Rührers gemindert. Dieses Phänomen wurde bereits im Jahr 1955 von Oyama und

Endoh beschrieben (Oyama et al. 1955). Es folgten weitere Veröffentlichungen zu dem Thema (Zlokarnik, 1973; Judat, 1976; Henzler, 1982).

Die Rührleistung wurde kontinuierlich durch das Energiemessgerät EKM 265 (Fa. Völkner Electronics) gemessen, welches die Leistungsaufnahme des Motors ermittelte. Für die Ermittlung der korrekten Daten wurde die Leerlaufleistung bestimmt, die durch Reibung in der Lagerung, im Antrieb oder durch andere Verluste, wie zum Beispiel Wärme verursacht wird. Durch die Differenzbildung der während der Kultivierung gemessenen Daten und der Leerlaufleistung, lässt sich der tatsächliche Leistungseintrag berechnen.

$$P = P_{Ges} - P_0 \quad (\text{Gl. 2.7})$$

## 2.8 Kultivierungsparameter

Den untersuchten Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen und unter sterilen Bedingungen Proben entnommen. Im Anschluss daran wurden diese aufgearbeitet.

### 2.8.1 Optische Dichte

Die Optische Dichte (OD) wurde mittels Trübungsmessung der Kultursuspension bei 546 nm mit dem Spektralphotometer LKB Ultraspec II der Firma Pharmacia gegen eine Blindprobe mit destilliertem Wasser vermessen. Bei OD-Werten größer 0,7 wurde die Probe entsprechend mit destilliertem Wasser verdünnt.

### 2.8.2 Biotrockenmasse (BTM)

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 10 ml Probe in vorgewogene Metallbecher gegeben und bei  $13.500 \text{ min}^{-1}$  und  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 Minuten (Sigma-Zentrifuge 3MK) zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung weiterer Parameter tiefgefroren, die Becher mit dem Pellet für 24 Stunden bei  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur vollständigen Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend ausgewogen.



### 2.8.3 Proteingehalt

Der Gehalt an extrazellulärem Protein wurde nach der Methode von Lowry [Lowry et al., 1951] bestimmt. Für weitere Messungen wurde der Überstand der BTM-Bestimmung verwendet.

#### Reagenzien

Lösung A: 20 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0.1 N NaOH

Lösung B: 10 g/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Lösung C: 20 g/l Kalium-Natriumtartat

Lösung D: Folin-Reagenz 1:2 verdünnt

Lösung E: Gebrauchsreagenz, das täglich frisch durch Mischen der Lösungen A, B und C im Verhältnis 100:1:1 angesetzt wurde.

1 ml der Lösung E und 100  $\mu\text{l}$  der Probenlösung wurden vereinigt und 10 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  der Lösung D zugegeben, die Probe gut durchmischt und weitere 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Darauf folgend wurde die Extinktion der Lösung bei 660 nm im Spektralphotometer gegen einen Blindwert mit 100  $\mu\text{l}$  destilliertem Wasser statt der Probelösung vermessen.

Im Bereich von 0-500 mg/l wurde eine Kalibriergerade mit Rinderalbuminlösung erstellt.

Zur Bestimmung des Zellproteins wurde 1 ml Kultursuspension 5 min bei 13.000  $\text{min}^{-1}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml 1N Natronlauge resuspendiert, 20 min im Thermoblock auf 95 °C erhitzt, nach Abkühlen auf Raumtemperatur 5 min intensiv gevortext und erneut zentrifugiert [Näveke und Tepper, 1986]. Der so erhaltene Überstand wurde (ggf. verdünnt) für den Proteintest nach Lowry eingesetzt.

### 2.8.4 Glycerinkonzentration

Die Glycerinkonzentration wurde mit Hilfe des Standardtests (UV Test, Best. Nr. 148270) der Firma R-Biopharm, Darmstadt, bestimmt. Die Testdurchführung erfolgte nach der beigefügten Anleitung.

Der Test beruht auf einer Enzymreaktion, bei der spezifisch Glycerin umgesetzt wird. Es wird Glycerin durch die Glycerokinase unter Verbrauch von ATP zu L-Glycerin-3-

Phosphat umgesetzt. Mittels Pyruvat-Kinase wird das entstandene ADP durch Phosphoenolpyruvat unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt. Das Pyruvat wird durch reduziertes NADH in Gegenwart des Enzyms L-Lactat-Dehydrogenase zu L-Lactat hydriert, wobei NADH zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird. Die verbrauchte NADH Menge ist stöchiometrisch der Glycerin-Menge äquivalent.

### 2.8.5 Ammoniumverbrauch

Der Ammoniumgehalt der Proben wurde durch die Methode nach Fawcett & Scott [Fawcett et al. 1960] bestimmt.

#### Reagenzien

Lösung A: 9.98 g/l Phenol und 0.0506 g/L Na-Nitroprussid in  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

Lösung B: 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest. und 0.4 mL konz. Na-hypochloritlösung (12% aktiv-Chlor)

Lösung C: 20 ml Lsg. B + 5g NaOH, ad.  $\text{H}_2\text{O}$  dest. zu 1l

Es wurden 0,5 ml Lösung A, 20  $\mu\text{l}$  Probe und 0,5 ml Lösung C dieser Reihenfolge entsprechend vermischt und bei 37 °C für 15 Minuten vorinkubiert. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Ansätze bei  $13000 \text{ min}^{-1}$  für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend bei 548 nm am Spektralphotometer gegen eine Blindprobe mit Wasser statt der Probelösung vermessen.

Für den Bereich von 0-1 mmol wurde eine Kalibriergerade mit Ammoniumchlorid erstellt.

### 2.8.6 Phosphatkonzentration

Die Phosphatbestimmung wurde nach einer Methode von Murphy & Riley durchgeführt [Murphy et al. 1962]. Für die Bestimmung wurde der Überstand der BTM-Messungen verwendet.

#### Reagenzien:

##### Lösung A:

150 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest. und 42 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (konz.)

50 ml Sulfaminlösung (=Amidosulfonsäure): 5 g  $\text{NH}_2\text{SO}_3/500 \text{ ml } \text{H}_2\text{O}$

100 ml Ammoniummolybdatlösung: 6,25 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ ml } \text{H}_2\text{O}$

50 ml Kaliumantimonyltartratlösung: 172 mg  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6/50 \text{ ml H}_2\text{O}$

Messkolben mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen.

Lösung B: Ascorbinsäurelösung: 0.1 g/ml (Die Lösung muss jeden Tag neu angesetzt werden.)

1 ml Probe wurde 10 Minuten bei 40 °C vortemperiert, anschließend 50 µl Lösung A zugegeben und gründlich gemischt. Danach wurden 32 µl Lösung B zugegeben, wiederum gründlich gemischt und die Probe für 25 Minuten bei 40 °C belassen. Die Messung erfolgte photometrisch bei 880 nm gegen eine Blindprobe mit Wasser statt Probelösung.

Eine Kalibriergerade wurde für den Bereich von 0-4 mg/l mit Kaliumphosphat erstellt.

### **2.8.7 Bestimmung der Glycoglycerolipid Konzentration (Produktbestimmung)**

Für die Produktbestimmung wurden 100 ml Kultursuspension bei  $13.000 \text{ min}^{-1}$  30 min mit einer Sorvall RC 5B plus Zentrifuge der Firma Du Pont zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml Dichlormethan/Methanol-Gemisch (2:1) resuspendiert. Die Suspension wurde zum Zellaufschluss 24 Stunden mit einem Magnetrührer gerührt. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend durch Filtration (Faltenfilter) abgetrennt, während das Permeat mittels Rotationsverdampfer eingengt wurde. Reste von Wasser wurden über eine Gefriertrocknung (Anlage der Firma Sigma) entfernt. Der so erhaltene Feststoff wurde in 5 ml Dichlormethan/Methanol (2:1) gelöst und 10 µl auf eine DC-Platte (Kieselgel auf Aluminiumfolie, 60F<sub>254</sub> der Firma Merck) mit Hilfe einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (65:15:2). Das Chromatogramm wurde mit einem Methanol/Schwefelsäure (1:1) Sprühreagenz behandelt und für ca. 2 Minuten bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurde das detektierte Produkt mit einem Densitometer CD 60 der Firma Desaga Heidelberg (Meßwellenläng: 580 nm) vermessen und den einzelnen Banden durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden entsprechende Konzentrationen zugeordnet.

### 2.8.8 Aminosäuren-Bestimmung

Die Messung der Aminosäurekonzentration im zellfreien Kulturüberstand erfolgte mit einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-Anlage (HPLC). Bei diesem Verfahren wurden die Aminosäuren nach einer Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd-Mercapto-ethanol (OPA-MCE) beim Durchlaufen einer Chromatographie-Säule auf Grund ihrer unterschiedlichen Polarität und der daraus resultierenden Wanderungsgeschwindigkeit getrennt. Detektiert wurden die Substanzen durch ihre fluoreszierenden Eigenschaften. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover.

### 2.8.9 Ausbeutekoeffizienten

Ausbeutekoeffizienten sind in erster Linie Kennzahlen für die Effizienz von Stoffumwandlungen in Mikroorganismen, da das Substrat nicht nur für die Zellvermehrung und Produktbildung, sondern auch für eine Vielzahl von zellerhaltenden Funktionen und Leistungen notwendig ist.

Der Ertragskoeffizient  $Y_{X/S}$  gibt zum Beispiel das Verhältnis von Zellmassebildung und Substratverbrauch pro Zeiteinheit an. In diesem Fall setzt sich der Koeffizient aus dem Verbrauch an Substrat für das Zellwachstum und dem Erhaltungsstoffwechsel zusammen. Eine Differenzierung wurde nicht vorgenommen.

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Biomassebildung}}{\text{Substratverbrauch}} = \frac{c_X(t_2) - c_X(t_1)}{c_S(t_2) - c_S(t_1)} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Weiterhin gibt es den Produktertragskoeffizienten  $Y_{P/S}$ , welcher den Quotienten aus Produktbildung und Substratverbrauch bildet.

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Produktbildung}}{\text{Substratverbrauch}} = \frac{c_P(t_2) - c_P(t_1)}{c_S(t_2) - c_S(t_1)} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

In der Praxis werden beide Koeffizienten häufig zur Ermittlung der Effizienz und damit zur Einstufung der Wirtschaftlichkeit verwendet. Im Vordergrund steht dabei die Umwandlung der Edukte in Biomasse und in die gewünschten Produkte.

Für die Optimierung eines Prozesses ist vor allem die Produktbildung pro Biomasse von Bedeutung.

$$Y_{P/X} = \frac{\text{Produktbildung}}{\text{Biomassebildung}} = \frac{c_P(t_2) - c_P(t_1)}{c_X(t_2) - c_X(t_1)} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

### 2.8.10 Produktbildungsrate

Die Produktbildungsrate gibt die differentielle Änderung der gebildeten Masse an gewünschtem Produkt pro Zeiteinheit [ $\text{kg h}^{-1}$ ] an. Wird die Produktbildungsrate auf das zur Kultivierung zur Verfügung stehende Volumen bezogen, erhält man die Produktivität oder auch „Raum-Zeit-Ausbeute“ [ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ].

$$\text{Pr}(t) = \frac{c_P(t_2) - c_P(t_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Gl. 2.11})$$

### 2.8.11 Sauerstoffverbrauchsrate, Kohlendioxidbildungsrate und respiratorischer Quotient

Während der Bioreaktorkultivierung wurden der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidbildung mit Hilfe einer Abgasanalyse online aufgezeichnet. Der nicht verbrauchte Sauerstoff wurde dabei aufgrund seiner paramagnetischen Eigenschaften vom Sauerstoffmessgerät Oxygor 6N erfasst. Die Konzentration an Kohlendioxid in der Abluft konnte über dessen Absorptionseigenschaften im Infrarotbereich vom Kohlendioxidmessgerät Unor 6N erfasst werden (beide Geräte sind Produkte der Firma Maihak Hamburg).

Aus den volumetrischen Anteilen an  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  lassen sich nach der Methode der quasistationären Stickstoffbilanz die Sauerstoffverbrauchsrate  $Q_{\text{O}_2}$  [ $\text{g/l} \cdot \text{h}$ ] und die Kohlendioxidbildungsrate  $Q_{\text{CO}_2}$  [ $\text{g/l} \cdot \text{h}$ ] durch die folgenden Gleichungen berechnen:

$$Q_{\text{O}_2} = \frac{V^N P^N X_{\text{O}_2}^E M G_{\text{O}_2}}{V_F R T^N} * \left[ 1 - \frac{X_{\text{O}_2}^A (1 - X_{\text{O}_2}^E - X_{\text{CO}_2}^E)}{X_{\text{O}_2}^E (1 - X_{\text{O}_2}^A - X_{\text{CO}_2}^A)} \right] \quad (\text{Gl. 2.12})$$

$$Q_{\text{CO}_2} = \frac{V^N P^N X_{\text{CO}_2}^E M G_{\text{CO}_2}}{V_F R T^N} * \left[ \frac{X_{\text{CO}_2}^A (1 - X_{\text{O}_2}^E - X_{\text{CO}_2}^E)}{X_{\text{CO}_2}^E (1 - X_{\text{O}_2}^A - X_{\text{CO}_2}^A)} - 1 \right] \quad (\text{Gl. 2.13})$$

Indizes: E: Eingang, A: Ausgang, N: Normverhältnisse (273,15 K, 1 bar)

$V^N$  = Volumenstrom [ $\text{l/h}$ ]

$V_F$  = Flüssigkeitsvolumen [ $\text{l}$ ]

P = Druck [bar]

R = allgemeine Gaskonstante [bar·l/mol·K]

T = Temperatur [K]

MG = Molekulargewicht [g/mol]

X = Luftmolenbrüche  $X_{O_2}^E = 0,20946$ ,  $X_{CO_2}^E = 0,00033$ ,  $X_{N_2}^E = 0,79$

Der respiratorische Quotient RQ ergibt sich aus dem Quotienten der entsprechenden stoffmengenbezogenen Größen  $q_{O_2} = Q_{O_2}/MG_{O_2}$  sowie  $q_{CO_2} = Q_{CO_2}/MG_{CO_2}$ .

## 2.9 Aufbereitung der Biomasse und Produktisolation

### 2.9.1 Anreicherung von Zellmaterial

Nach Erreichen der stationären Phase wurde der Inhalt des Rührkesselreaktors in einer Padberg Becherzentrifuge aufgearbeitet. Die Zellmasse wurde aus dem Zentrifugenbecher entnommen, in ein vakuumfestes Vorratsgefäß gefüllt und an der Sigma Gefriertrocknungsanlage 4 Tage getrocknet. Das auf diese Weise behandelte Zellmaterial diente als Ausgangssubstanz für die Isolierung des Glycoglycerollipids.

### 2.9.2 Isolierung der Glycoglycerolipide und des Kohlenstoffgerüsts GG2

Das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde unter Rühren in  $CH_2Cl_2/MeOH$  (2/1) für 24 Stunden aufgeschlossen. Die Zellfragmente wurden durch Filtration (Faltenfilter) abgetrennt und das Permeat am Rotationsverdampfer einrotiert. Der Rückstand wurde anschließend in 10 ml  $CHCl_3/MeOH/H_2O$  (65/15/2) gelöst und über ein Membranfilter (Porengröße 20  $\mu m$ ) abfiltriert, um auch kleinste Feststoffanteile zu entfernen.

Die Isolierung der Einzelkomponenten des Zellextraktes erfolgte anschließend mittels einer MPLC-Anlage (Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1:** Bedingungen der verwendeten MPLC-Anlage zur Gewinnung von GGL2, GGL2a, GG2 und GGL5

Parameter	Einstellungen bzw. Bedingungen
Trennsäule	l = 31 cm, d = 2,5 cm
Stationäre Phase	Kieselgel 60, 40-63 µm
Mobile Phase	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (65/15/2)
Mobile Phase (GG2)	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (30/40/10)
Einstellung des Fraktionssammlers	1 ml/min

### 2.9.3 Analytische Dünnschichtchromatographie

Durch gekoppelte Dünnschichtchromatographie und Densitometrie wurden die einzelnen Fraktionen, welche aus dem Auftrennen des Zellextrakts mittels MPLC gewonnen wurden, auf ihren Gehalt an Glycoglycerolipid überprüft (Tabelle 2.2). Ebenso erfolgte eine erste Analyse des Umsatzes der Acylierungsreaktion über diese Methode.

**Tabelle 2.2:** Bedingungen für die analytische Dünnschichtchromatographie bei den Enzymatischen Umsetzungen

Parameter	Glycoglycerolipid	Hydrolysat
Stationäre Phase	20x20 cm Kieselgel 60 F <sub>254</sub> (Merck)	20x20 cm Kieselgel 60 F <sub>254</sub> (Merck)
Mobile Phase	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (65/15/2)	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (30/40/10)
Detektion	α-Naphtol	α-Naphtol
Wellenlänge	580 nm	580 nm

## **2.10 Chemische Methoden**

### **Alkalische Verseifung des Glycoglycerolipids [Lokotsch, 1994]**

Zur Gewinnung der Diglycosylglycerin-Stuktur mussten die Fettsäuren (Abbildung 1.1) abhydrolysiert werden. Dies erfolgte, indem 150 mg reines Diglycosylglycerolipid in 10 ml 0,5 molarer NaOH 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt, abgekühlt und mit 0,5 normaler  $\text{H}_2\text{SO}_4$  neutralisiert wurde. Durch die Zugabe von 20 ml Methanol konnte das  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ausgefällt und durch Filtration abgetrennt werden. Die abgespaltenen Fettsäuren wurden dreimal mit je 20 ml n-Hexan extrahiert und das hydrolysierte Rohprodukt anschließend gefriergetrocknet.

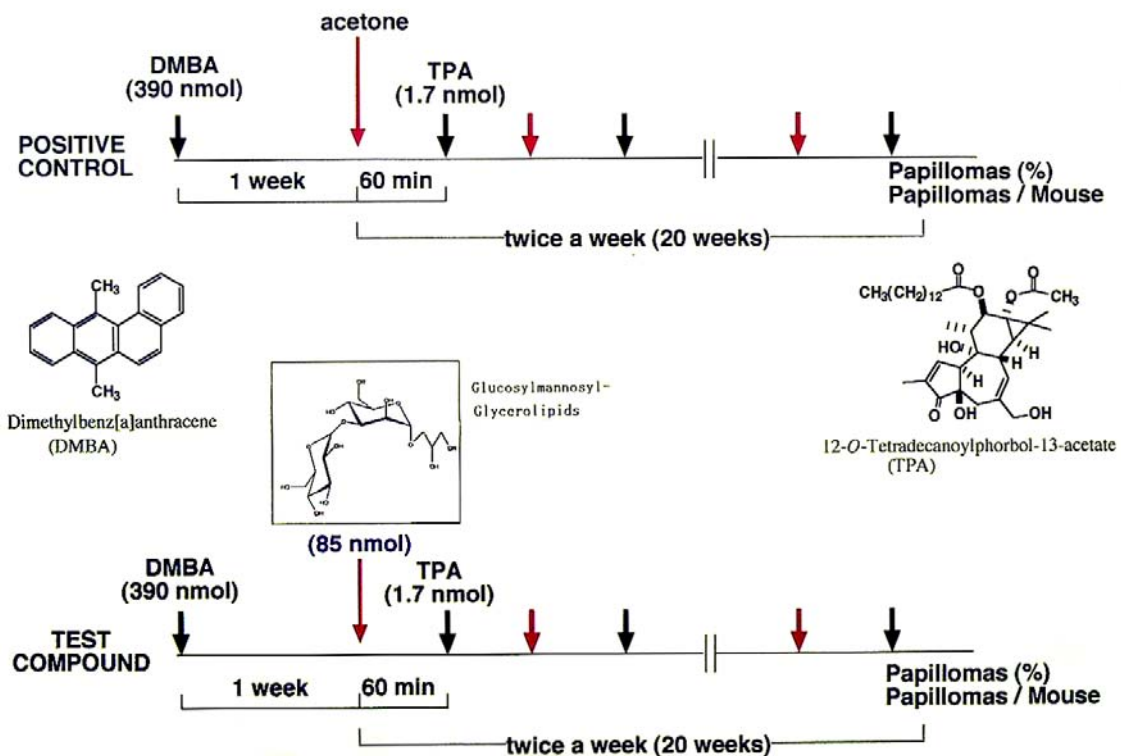
## **2.11 Untersuchung von biologischen Aktivitäten**

### **2.11.1 Agardiffusionstest mariner Bakterienstämme verschiedener phylogenetischer Gruppen**

Mit Hilfe des Agardiffusionstestes werden Kulturextrakte bakterieller Isolate auf antimikrobielle Wirkung getestet. Auf entsprechende Nährböden (Marine Broth) wurden sterile Filterplättchen gelegt und mit den Extrakten aus dem Kulturüberstand und Zellen sowie den aufgereinigten Metaboliten getränkt. Die Konzentration der Probe wurde auf 1 mM eingestellt. Um eine ausreichende Diffusion zu gewährleisten, wurden die Platten zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen und anschließend mit den jeweiligen marinen Testorganismen besprüht. Als Vergleichssubstanz wurde Penicillin G aufgetragen. Nach dem Bebrühen der Nährböden konnten die entstandenen Hemmhöfe vermessen werden.



### 2.11.2 In vivo „two-stage mouse skin carcinogenesis“ Test



**Abbildung 2.1:** Schematischer Ablauf eines „two-stage mouse skin carcinogenesis“ Test

Für diesen Test wurden 6 Wochen alte, weibliche Mäuse auf dem Rücken rasiert und in zwei Gruppen unterteilt. Die freigelegten Stellen der Haut wurden als erstes der Abbildung 2.1 entsprechend behandelt (100µg DMBA in 0,1 ml Aceton). Die Tinktur wurde mit dem Pinsel aufgetragen. Eine Woche nach dieser Behandlung wurde zweimal wöchentlich als Promotor TPA in einer Konzentration von 1µg pro 0,1 ml Aceton aufgetragen. Eine Stunde vor dieser Behandlung wurde die Stelle entweder mit Aceton (positiv Kontrolle Gruppe 1) oder mit der Testsubstanz (85 nmol) in Aceton gelöst (Gruppe 2) behandelt. In den nächsten 20 Wochen wurde die Bildung der Papilloma dokumentiert [Mendoza et al. 2005, Nagaoka et al. 2005].

Dieser Test wurde an der Medizinischen Universität Kyoto von Dr. H. Tokuda durchgeführt.

### 2.11.3 Test zur Anti-Tumor- Promoting-Aktivität

Dieser Test wurde ebenfalls an der Medizinischen Universität Kyoto durchgeführt. Die Inhibierung des frühen Antigens des Epstein-Barr Virus kann über eine indirekte Immunfluoreszenzmessung bestimmt werden. Dazu werden  $1 \cdot 10^6$  Raji Zellen für 48 Stunden bei 37°C in 10% igem RPMI 1640 Medium kultiviert. 1 ml des Mediums enthält 4mM n-Buttersäure und 32 nM TPA (positiv Kontrolle). Die anderen Ansätze enthalten 5 µl in DMSO gelöster Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen. An Hand der Fluoreszenz wird die Wirksamkeit bestimmt. Die Vitalität der Zellen wird mikroskopisch über den Farbstoff „Trypan blue“ bestimmt [Colombo et al. 2004, Ito et al. 2005].

## 2.12 Strukturaufklärung

### 2.12.1 Kernspinresonanzspektroskopie

Die Untersuchungen der Substanzen wurden an Bruker ARX 400 und DMX 600 Spektrometern vorgenommen und dabei  $^1\text{H}$ -NMR-Standardspektren und  $^1\text{H}$ -breitbandgekoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren angefertigt. Zur näheren Bestimmung der Multiplizität der  $^{13}\text{C}$ -Signale wurden DEPT-135-Spektren aufgenommen. Für die genauere Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NMR und der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale wurden für alle Substanzen zweidimensionale (H,H)-COSY und (C,H)-korrelierte-HMBC Spektren aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde in allen Fällen  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (70:30 v/v) benutzt und als interner Standard Tetramethylsilan verwendet.

### 2.12.2 Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurden Negativ- und Positiv-Ionen-Spektren aufgenommen. Zur vollständigen qualitativen Charakterisierung aller Bestandteile, speziell der Fettsäuren, wurden Methanolyse-Extrakte einer kombinierten gaschromatographischen-Massenspektroskopischen Analyse unterzogen. Dazu wurde ein Kapillargaschromatograph Modell HRGC 5160 mega series der Fa. Carlo Erba/Hofheim/Ts, eingesetzt, welcher mit einem Quadrupol-Massenspektrometer, Modell MAT 4515 der Firma Finnigan/USA, gekoppelt war.

### 3. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse von Schüttelkolben und Bioreaktor-Kultivierungen des Stammes *Microbacterium* spec. DSM 12583 und der Stämme Hel 12/1 und Hel 12/2 dargestellt werden. Die Untergliederung gestaltet sich wie folgt:

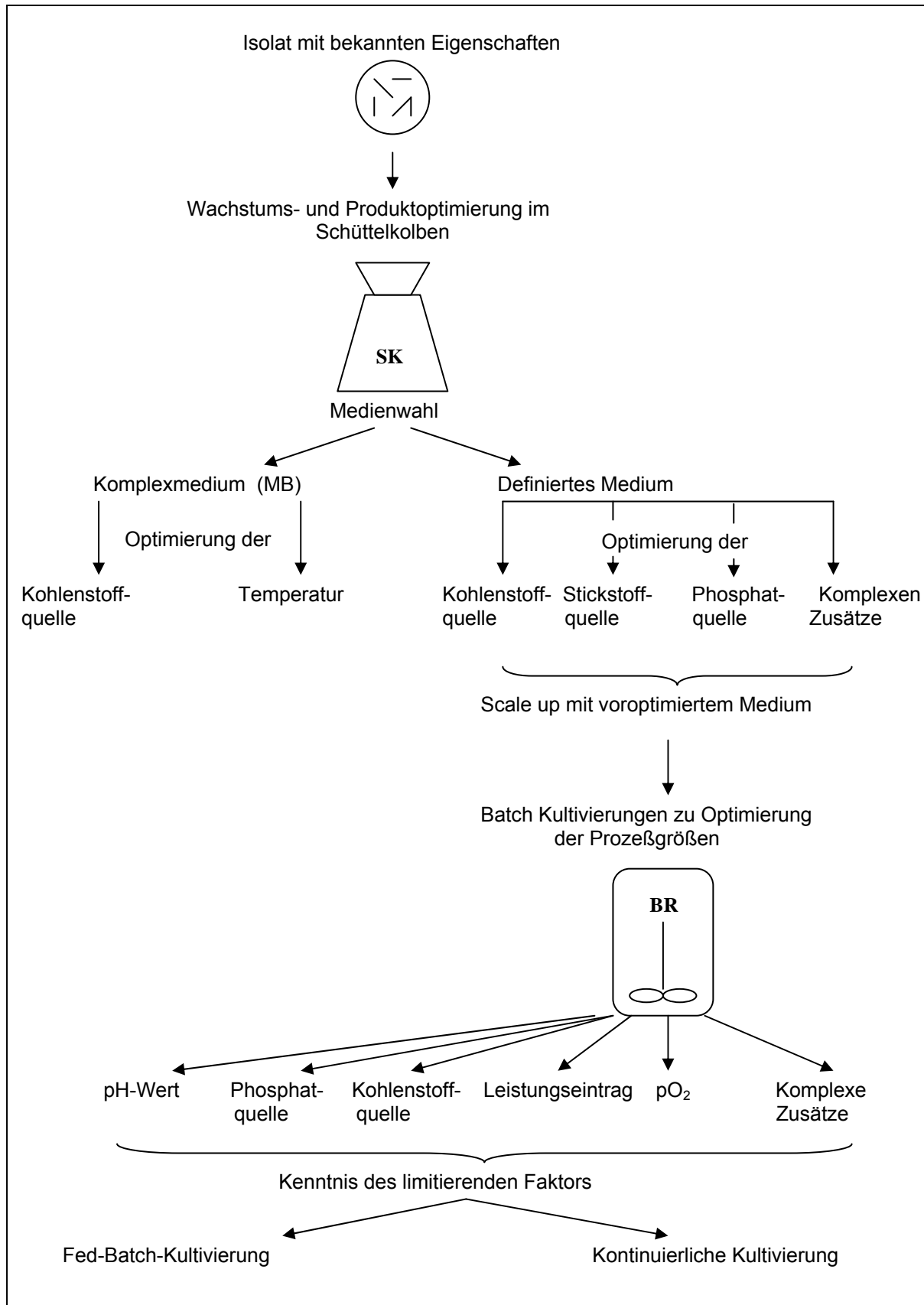
1. *Microbacterium* spec.

- Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung
- Bioreaktorexperimente zur Produktoptimierung
- Modellierung der Wachstumsexperimente
- Chemische Modifikation des Produktes
- Tests zur Bioaktivität

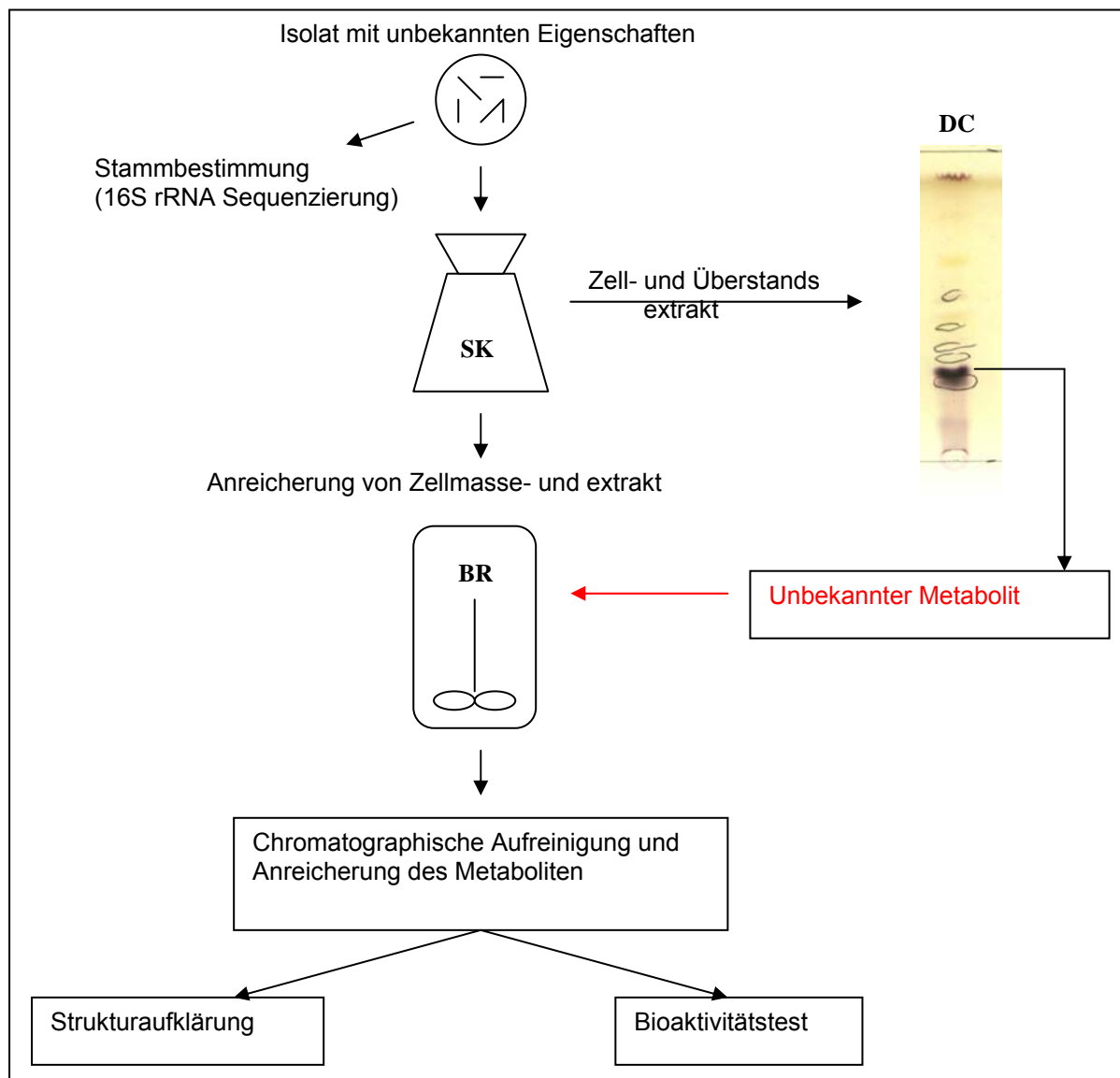
2. *Microbacterium* spec. Hel 12/1 und  
*Micrococcus luteus* Hel 12/2

- Stammbestimmung
- Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung  
bezüglich Wachstum und Produktbildung
- Bioreaktorkultivierungen unter suboptimalen Bedingungen  
(zur Isolierung der Produkte)
- Charakterisierung der isolierten Metabolite über spektroskopische Daten, hinsichtlich biologischer Aktivitäten

In beiden Fällen wurden ähnliche Aspekte untersucht, die sich jedoch in einigen Punkten unterschieden. Um der Gliederung im Ergebnissteil besser folgen zu können soll mit den nächsten Graphiken die Vorgehensweise veranschaulicht werden (Abbildung 3.1 und 3.2).



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung zur Wachstums- und Produktoptimierung beim Stamm *Microbacterium spec. DSM 12583* (MB Marine Broth Medium)



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise beim Screening nach biologisch aktiven Substanzen bei marinen Bakterien (SK Schüttelkolben, BR Bioreaktor, DC Dünnschichtchromatographie), Vorgehensweise für die Stämme Hel *Microbacterium* spec. 12/1 und *Micrococcus luteus* Hel 12/2

### 3.1 *Microbacterium spec.* DSM 12583

Die in früheren Arbeiten erzielten Ergebnisse des Stammes *Microbacterium spec.* beschäftigten sich vorwiegend mit der Isolierung und Anreicherung des Bakteriums vom Schwamm *Halichondria panicea* und der Untersuchung des Metaboliten-spektrums hinsichtlich biologisch aktiver und chemisch ungewöhnlicher Substanzen. Dabei wurde mit komplexen und definierten Seewassermedien gearbeitet und erste Optimierungsexperimente durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse bildeten eine geeignete Grundlage für diese Arbeit.

### 3.2 Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung

Weniger als 5 % der bisher bekannten marinen Bakterien sind unter Standardbedingungen kultivierbar. Ein wichtiger Schritt ist die geeignete Medienwahl. Bei marinen Mikroorganismen erfolgt die erste Kultivierung meist auf Komplexmedien. Eines der am häufigsten verwendeten ist „Marine Broth“. Das Wachstum vom *Microbacterium spec.* auf diesem Medium war sehr langsam. Das Metaboliten-spektrum wies bei verschiedenen Experimenten zum Beispiel der Variation der Kohlenstoffquelle kaum Unterschiede auf. Durch den Zusatz von Glucose als zusätzlicher Kohlenstoffquelle konnte jedoch das Wachstum und damit verbunden die Ausbeute des in dieser Arbeit betrachteten Glycoglycerolipides gesteigert werden. Im Zusammenhang mit der Medienoptimierung wurde auf das definierte Medium nach Passeri [Wicke 1999] gewechselt. Damit verbunden wurden weitere Kohlenstoffquellen variiert und es zeigte sich, dass durch die Zugabe von Glycerin eine beträchtliche Steigerung der Biomassebildung und darüber hinaus der Produktbildung stattfand.

In den vergangenen Arbeiten wurde ausschließlich mit Glucose kultiviert, so dass die hohe Produktausbeute bei der Kultivierung auf Glycerin weiterer Untersuchungen bedurfte.

### 3.2.1. Medienbesonderheiten

Für die ersten Experimente mit der neuen C-Quelle wurde das optimierte Medium mit den Erkenntnissen von Wicke [1999] übernommen. Es handelt sich dabei um ein definiertes Medium (Material und Methoden 2.3.2), welches alle im natürlichen Meerwasser vorkommenden Salze enthält. Zusätzlich wurden Hefeextrakt und Bacto Pepton als komplexe Bestandteile zugegeben (Inhaltsstoffe: Diskussion 4.2).

Die Startversuche mit dem Medium zeigten zwei Besonderheiten, die im Folgenden kurz erläutert werden.

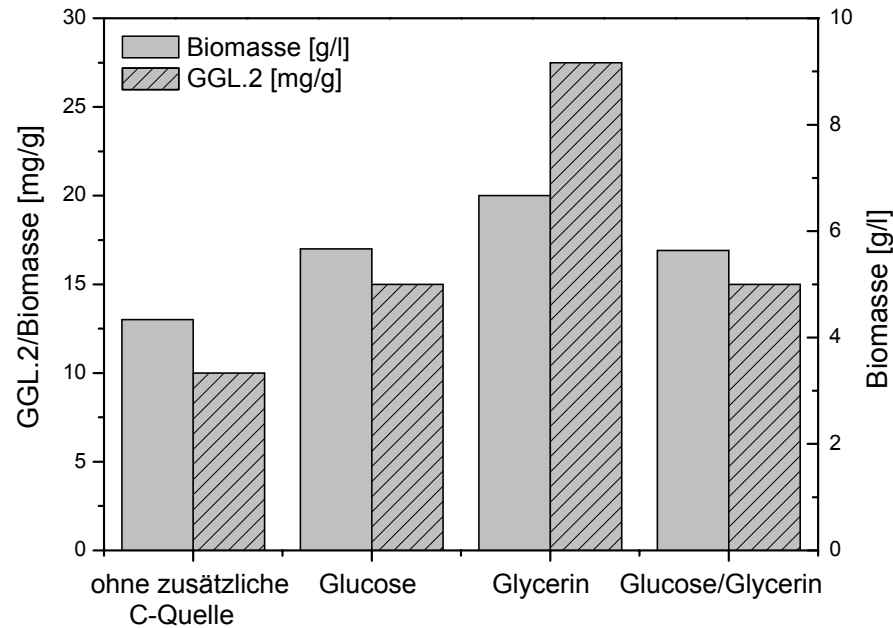
In der Vergangenheit hatte es sich bewährt, die Kohlenstoffquelle getrennt autoklaviert dem Medium zuzugeben, um Nebenreaktionen mit anderen Medienbestandteilen zu vermeiden (z.B. Glucose, Maillard-Reaktion).

Bei dieser Verfahrensweise und der Verwendung von Glycerin als zusätzlichem Energieträger, zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede im Wachstum und der Produktbildung.

Weiterhin ist bei den Schüttelkolbenkultivierungen der Anfangs-pH-Wert von entscheidender Bedeutung, da dieser sich im Laufe der Kultivierung auf Grund von Stoffwechselvorgängen in ein saures oder basisches Milieu verschiebt. Bei dem Medium nach Passeri liegt dieser zwischen 7,0 und 7,5. In diesem Bereich ist das Ausfallen von Niederschlag zu beobachten.

### 3.2.2 Ausgangssituation

Bevor auf die ersten Experimente zur Medienoptimierung im Schüttelkolben eingegangen wird, soll mit dem ersten Diagramm die Ausgangssituation dargestellt werden (Abbildung 3.3). In diesem Graphen sind vergleichend die Kultivierungen auf Glucose, Glycerin, einem Mischsubstrat (Glucose/Glycerin 10 g/l/10 g/l) sowie eine Kultivierung ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle aufgetragen. In allen Versuchen war durch die Zugabe von Bacto Pepton und Hefeextrakt eine Grundkohlenstoffquelle, Stickstoffquelle sowie Phosphatquelle enthalten. Die Medienzusammensetzung dieses Versuches entspricht der des SM1 aus der Arbeit von Wicke (Material und Methoden 2.3.2). Die C-Quelle wurde in einer Konzentration von 20 g/l zugegeben.



**Abbildung 3.3:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung unterschiedlicher zusätzlicher C-Quellen, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, Medium: SM1 (Material und Methoden 2.3, zusätzliche C-Quelle 20 g/l)

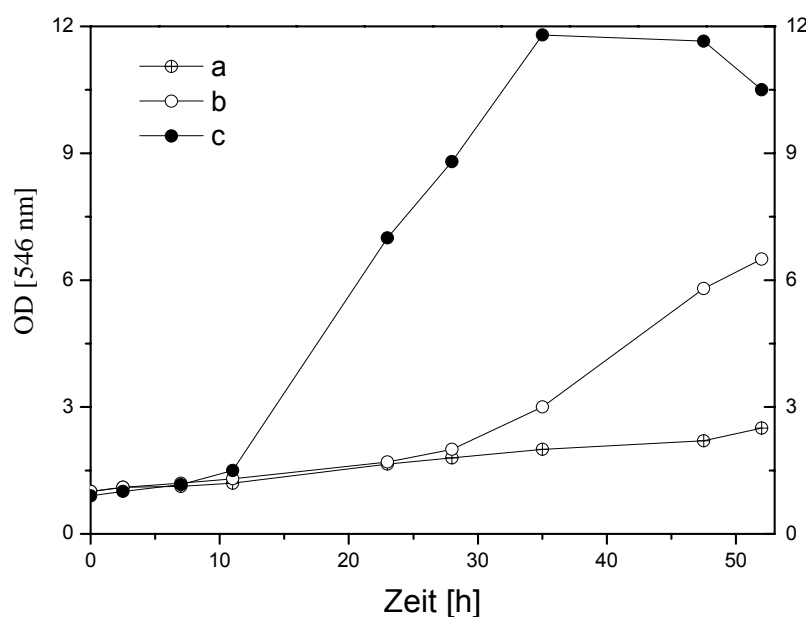
Das Ergebnis dieses Versuches bestätigte die Aussagen aus der Arbeit von Wicke [Wicke 1999]. Das Glycoglycerolipid wird auch ohne die Zugabe einer zusätzlichen C-Quelle gebildet, jedoch mit einer geringen Ausbeute. Diese wurde durch den Zusatz von Glucose gesteigert und erreichte einen durchschnittlichen Wert von 15 mg/g Biomasse. Bei dem Versuch mit Glycerin konnte ein Maximum mit rund 27 mg/g Biomasse erzielt werden. Mit einer durchschnittlichen Biomasse von 7 g/l im Schüttelkolben erhält man 189 mg/l Glycoglycerolipid. Da sowohl Glucose als auch Glycerin gut verstoffwechselt werden können, wurde ein Experiment mit beiden Substraten in einem Schüttelkolben durchgeführt. Es wurden jeweils 10 g/l der Komponenten verwendet, um die 20 g/l C-Quelle der anderen Ansätze nicht zu überschreiten und die Werte somit vergleichen zu können. Die Werte von Biomasse- und Produktbildung glichen denen des Versuches mit Glucose.



### 3.2.3 Grundlegende Schüttelkolbenexperimente

Ein erster Schritt in Richtung Medienoptimierung bestand darin, den oben genannten Problemen bezüglich des Mediums auf den Grund zugehen. Der oberen Reihenfolge entsprechend wird zunächst auf die Wachstumsunterschiede bezüglich des Glycerins eingegangen.

Meistens wirken Zwischenprodukte, die aus komplexen Bestandteilen und der Kohlenstoffquelle gebildet werden (z.B. Maillardreaktion) störend auf das Wachstum. Bei der Maillardreaktion handelt es sich um eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion, im Laufe derer Zucker, Aminosäuren, Peptide und Proteine zu heterozyklischen Endprodukten reagieren. Der störende Einfluss dieser Reaktion trat unter den gewählten Bedingungen nicht auf (Abbildung 3.4).



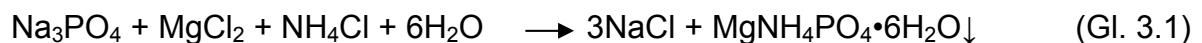
**Abbildung 3.4:** Einfluss einer unterschiedlichen Medienvorbereitung auf das Wachstum des *Microbacterium spec.*, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, Medium: SM1 (Material und Methoden 2.3, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glycerin)

- a) alle Medienbestandteile werden zusammen autoklaviert;
- b) Salzlösung wird getrennt von der Komplexlösung mit dem Glycerin autoklaviert;
- c) Glycerinlösung, Salzlösung, Komplexlösung werden getrennt autoklaviert

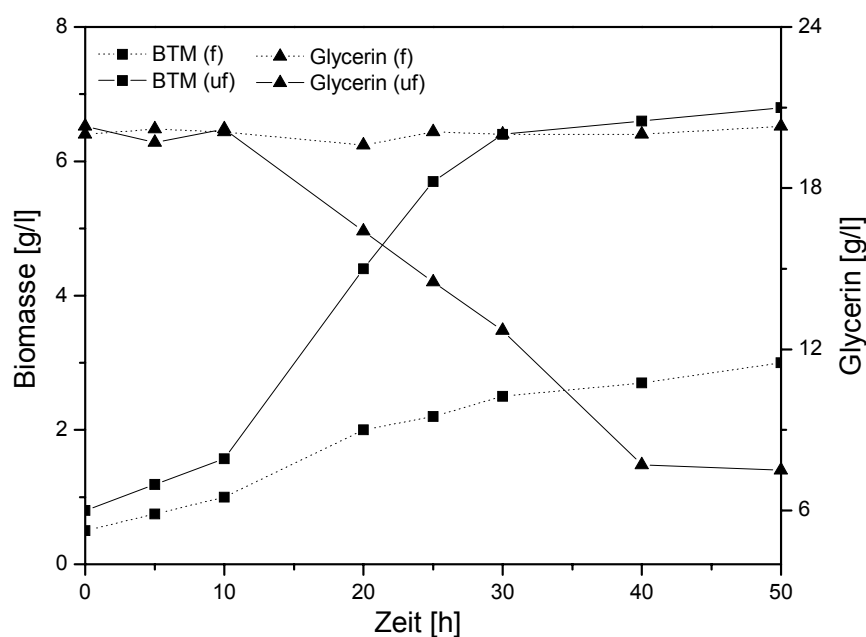
Alle drei Ansätze wurden aus der gleichen Vorkultur beimpft, hatten denselben Anfangs-pH-Wert und wurden nach einer Kultivierungszeit von 52 Stunden abgebrochen. Trotz scheinbar gleicher Voraussetzungen waren deutliche Unterschiede im Wachstumsverlauf erkennbar (Abbildung 3.4).

Versuch c) zeigte die typischen Merkmale. Nach einer kurzen lag-Phase ging die Kultur nach 10 Stunden in die exponentielle Phase über und erreichte nach ungefähr 32 Stunden die stationäre Phase. Dem gegenüber gestaltete sich die lag-Phase des Versuches b) deutlich länger und der Übergang in die exponentielle Phase begann nach 23 Stunden. Die stationäre Phase wurde beim Abbruch des Versuches noch nicht erreicht. Im Fall a) fand das Wachstum nur sehr eingeschränkt statt. Für weitere Versuche wurde die Kohlenstoffquelle (Glycerin) daher nicht separat autoklaviert.

Die zweite Besonderheit war der Niederschlag im Medium. Auf Grund der Vielzahl der in der Nährlösung enthaltenen Salze ist eine Beeinflussung des Löslichkeitsproduktes der Salze möglich. Bei dem im Medium verwendeten Natriumhydrogenphosphat handelt es sich um ein Salz, aus dem in Lösung schwer lösliche Phosphate ausfallen können (z.B. Gleichung 3.1).



Da der Niederschlag dem Organismus nicht mehr zur Verfügung steht, müssten die Wachstumsparameter eines filtrierten und unfiltrierten Mediums keine großen Unterschiede aufweisen.

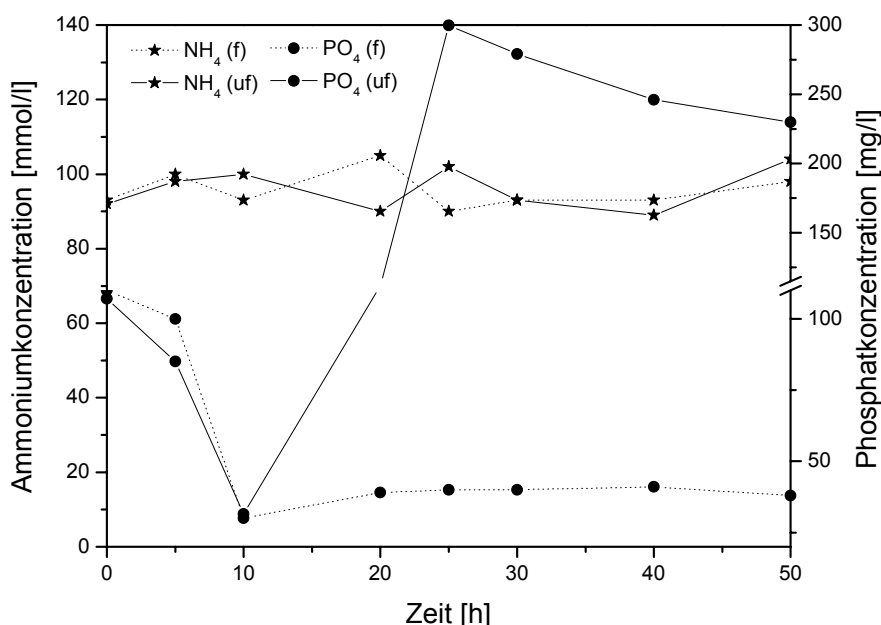


**Abbildung 3.5:** Einfluss der Medienpräparation auf Biomasseproduktion und Glycerinabbau des *Microbacterium spec.*, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, Medium: SM1 (Material und Methoden 2.3, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glycerin)  
(f) filtriertes Medium  
(uf) unfiltriertes Medium

Das Wachstum des *Microbacterium spec.* auf dem unfiltrierten Medium war deutlich besser (Abbildung 3.5). Mit einer Biomasseproduktion von 7 g/l nach 50 Stunden, war der Wert fast doppelt so hoch wie der des filtrierten Mediums zu diesem Zeitpunkt. Auffällig war die konstante Glycerinkonzentration von 20 g/l während der Kultivierung des filtrierten Mediums. Von einer Verstoffwechselung des Glycerins konnte in diesem Fall nicht ausgegangen werden. Der Wert für die Biomasseproduktion glich dem des Mediums ohne zusätzliche C-Quelle. Da für die Produktion von Biomasse ein C-Quelle benötigt wird, kann diese nur aus dem Komplexanteil in Form der Aminosäuren resultieren.

Gegensätzlich zu der konstanten Glycerinkonzentration des filtrierten Mediums war der Verlauf vom Glycerin in dem unfiltrierten Medium über der Zeit. Die Abnahme des Substrates begann nach 10 Stunden und erreichte nach 50 Stunden einen Wert von 7,5 g/l. Zum gleichen Zeitpunkt (10 h) war ein deutlicher Anstieg der Biomasse zu beobachten.

Ähnliche Kontraste wie beim Glycerin traten bei den Prozessparametern Phosphat- und Ammoniumkonzentration auf (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Einfluss der Medienpräparation auf Ammonium- und Phosphatabbau des *Microbacterium spec.*, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, Medium: SM1 (Material und Methoden 2.3, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glycerin)  
(f) filtriertes Medium  
(uf) unfiltriertes Medium

Auffällig war das gleichbleibende Konzentrationsprofil des Ammoniums in beiden Kultivierungen. Da bei der Verstoffwechselung von Aminosäuren Ammonium freigesetzt werden kann [Stryer 1995], konnten sich Abbau und Anstieg der Ammoniumkonzentration überlagern.

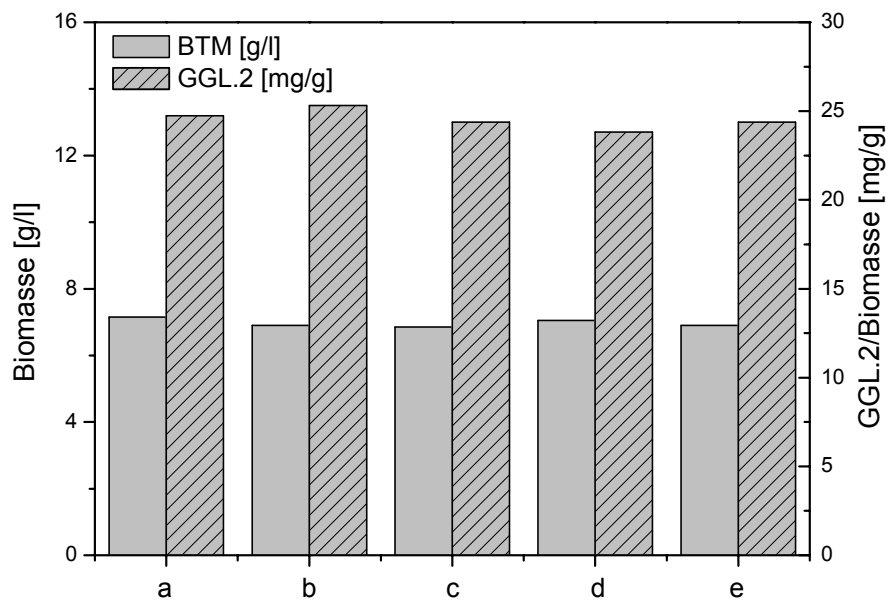
Die Phosphatgehalte zeigten dagegen ähnlich der Biomasse und dem Glycerin deutliche Unterschiede zwischen den Ansätzen.

Der erste Hinweis auf die schwer löslichen Phosphate im Niederschlag wurde durch die niedrigen Anfangskonzentrationen von ungefähr 70 mg/l Phosphat gegeben. Bei vollständiger Lösung des Natriumhydrogenphosphat zuzüglich des Anteils der in den komplexen Bestandteilen (120 mg/l) enthalten ist, hätte die fünffache Menge vorliegen müssen. Innerhalb der ersten 10 Stunden wurde bei beiden Experimenten eine starke Reduzierung dieser Größe bis auf 10 mg/l beobachtet. Während diese Konzentration bei dem filtrierten Medium konstant blieb, fand im Gegensatz dazu bei

dem unfiltrierten ein Anstieg der Konzentration auf 140 mg/l Phosphat statt. Diese reduzierte sich nach 25 Stunden wieder auf einen Wert von 120 mg/l Phosphat.

### 3.2.4 Experimente zur Medienoptimierung

Auf Grund des gegensätzlichen Verhaltens von Ammonium und Phosphat galt der nächste Schritt der Medienoptimierung dieser Prozessgrößen. In der Arbeit von Wicke wurde beschrieben, dass der Einsatz von Natriumhydrogenphosphat nur während der Bioreaktorkultivierungen einen positiven Effekt auf das Wachstum ausübte. Im Schüttelkolben hatte der Einsatz dieses Salzes negativen Einfluss auf die Kultur ausgeübt. Weiterhin wurde spekuliert, welchen Effekt Spurenelemente wie zum Beispiel Zink auf das Wachstum ausübten. Auf diesen Erkenntnissen und den ersten eigenen Versuchsergebnisse aufbauend, sind die folgenden Experimente durchgeführt worden. Dabei wurden Kultivierungen ohne veränderte Bedingungen (Material und Methoden 2.3.2), ohne Zusatz von Ammoniumchlorid, eine ohne Zusatz von Phosphat, sowie eine Kultivierung mit zusätzlicher Spurenelementlösung verglichen (Abbildung 3.7).



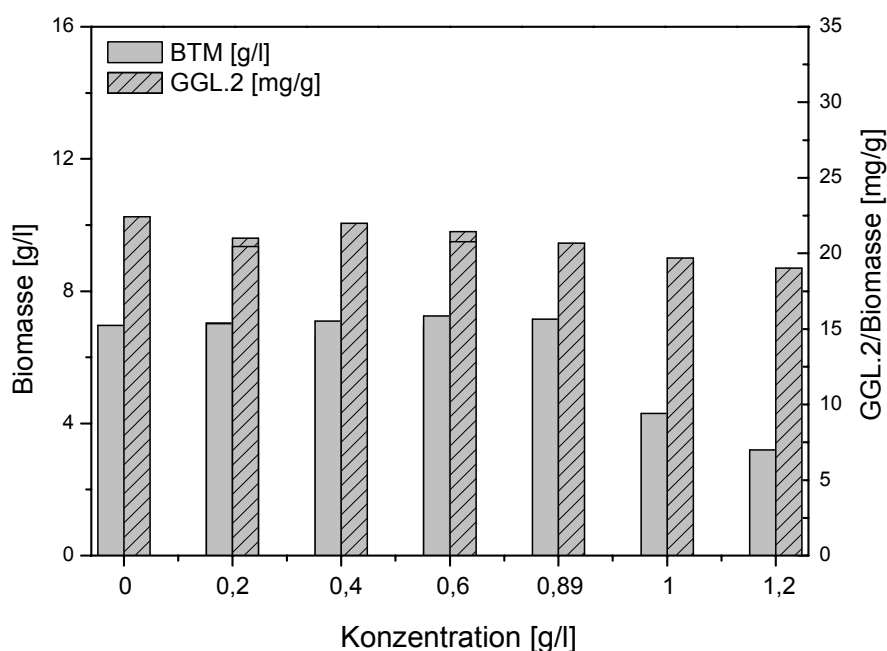
**Abbildung 3.7:** Einfluss von Ammoniumchlorid, Natriumhydrogenphosphat und einer Spurenelementlösung auf die Biomassebildung und spezifische Produktbildung des *Microbacterium spec.*, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, Medium: SM1 (Material und Methoden 2.3, zusätzliche C-Quelle: 20 g/l Glycerin)

- a) SM1
- b) SM1 ohne NH<sub>4</sub>Cl
- c) SM1 ohne Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O
- d) SM1 ohne NH<sub>4</sub>Cl und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O
- e) SM1 mit Lösung 1 (Material und Methoden 3.2)

Die Biomasse- und spezifische Produktkonzentrationen der einzelnen Versuche unterschieden sich kaum (Abbildung 3.7). Die spezifischen Glycoglycerolipidproduktionen liegen durchschnittlich bei einer Konzentration von 27 mg/g Biomasse. Auffällig bei dem Experiment ohne Ammoniumchlorid war ein stärker ausgeprägter Niederschlag beim Einstellen des pH-Wertes.

### 3.2.5 Bestimmung der Phosphatkonzentration

In früheren Versuchen der Kultivierung des Stammes auf Glucose wurde der negative Einfluss des Phosphates erst bei höheren Konzentrationen besonders deutlich, so dass zusätzlich zu dem Versuch (Abbildung 3.7) ein Konzentrationsprofil für diese Größe erstellt wurde (Abbildung 3.8).



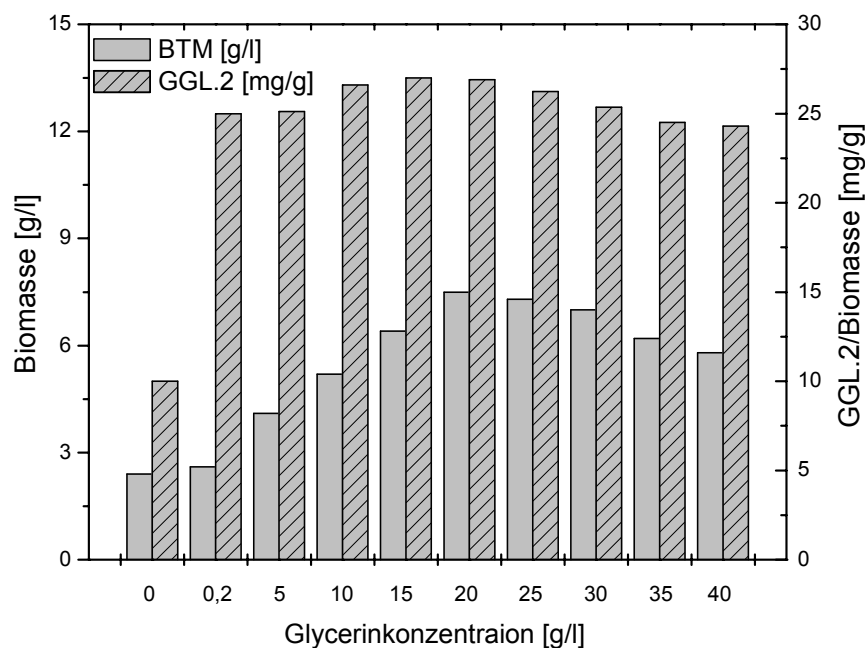
**Abbildung 3.8:** Einfluss der Natriumhydrogenphosphat-Konzentrationen auf die Biomasse und spezifische Produktbildung des *Microbacterium spec.*, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, Medium: SM1 (Material und Methoden 2.3 ohne Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, zusätzliche C-Quelle: 20 g/l Glycerin)

Es konnte belegt werden, dass die Phosphatkonzentration bis zu einem Wert von 0,89 g/l keinen entscheidenden Einfluss auf die Biomasse- und Produktbildung ausübte. Die Werte lagen durchschnittlich bei einer Biomasse von 7 g/l und einer Produktausbeute ähnlich den anderen Experimenten bei 27 mg/g Biomasse.

Eine Überschreitung dieser Konzentration zeigte jedoch, dass bei gleich bleibender Produktkonzentration die Biomasse abnahm. Mit einer Natriumhydrogenphosphatkonzentration von 1 g/l wurden in der gleichen Kultivierungszeit von 50 Stunden nur 4,5 g/l Biomasse gebildet. Diese wurde durch die Erhöhung der Konzentration an Natriumhydrogenphosphat auf 1,2 g/l weiter gesenkt. Die Biomasse erreichte bei diesem Versuch einen Wert von 3 g/l.

### 3.2.6 Bestimmung der Glycerinkonzentration

Die Kohlenstoffquelle gilt als Hauptenergieträger und hat daher einen besonderen Stellenwert während einer Kultivierung. Mit der Glycerinkonzentration sollte diese Prozessgröße als nächstes innerhalb der Arbeit überprüft werden. Der Grundansatz des Mediums änderte sich nicht. Zu gleichen Teilen wurden Hefeextrakt und Bacto Pepton zugesetzt und Glycerin als Variationsparameter betrachtet.

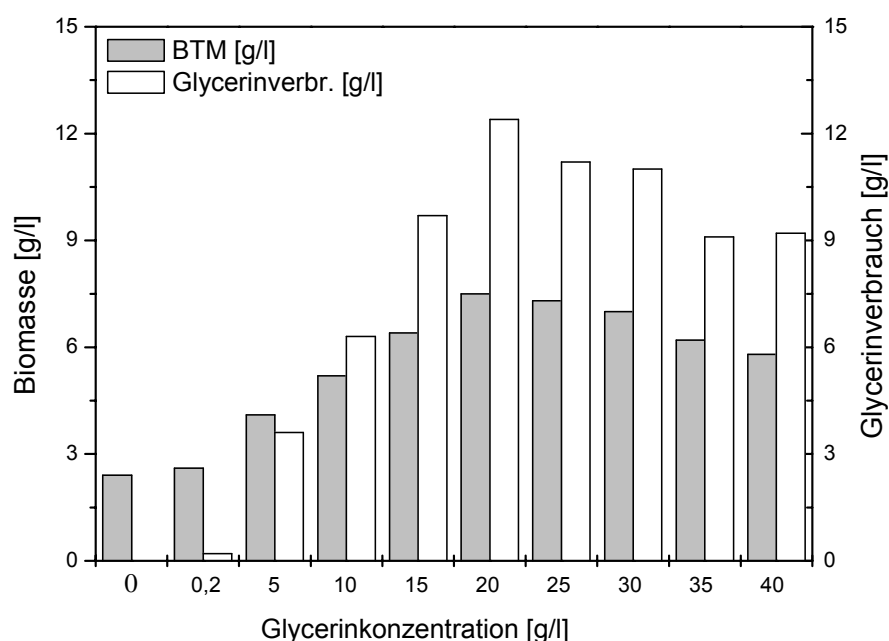


**Abbildung 3.9:** Einfluss der Glycerinkonzentration auf Biomasse und spezifische Produktkonzentration des *Microbacterium spec.*, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, Medium: SM1<sub>reduziert</sub> (Material und Methoden 2.3)

Es zeigte sich deutlich, dass kleine Änderungen der Glycerinkonzentration starke Änderungen in der Produktausbeute hervorriefen (Abbildung 3.9). Gegensätzlich zu den Versuchen mit Glucose, in denen erst Konzentrationen über 10 g/l Glucose eine Erhöhung der Produktausbeute hervorriefen, führten beim Glycerin schon kleinere Mengen zu einer Steigerung der Produktivität. Selbst Zugaben von unter einem

Gramm pro Liter Glycerin, erzielten eine erhebliche Steigerung des Produktes. Die spezifische Ausbeute an Glycoglycerolipid blieb bis zu einer Konzentration von 25 g/l Glycerin konstant, so dass die Biomasseproduktion und der Ertragskoeffizient entscheidende Kriterien bildeten. Die Biomassebildung stieg mit der Erhöhung der Glycerinkonzentration und blieb in dem Bereich von 20 bis 25 g/l Glycerin mit einer Konzentration von 7 g/l konstant. Ab einer Konzentration von 30 g/l nahm die Biomasse wieder ab und sank bei einer Substratmenge von 40 g/l auf einen Wert von 6,2 g/l. Die Produktausbeute begann ebenfalls bei einer Konzentration von 30 g/l leicht abzunehmen. Dieser Verlauf hatte sich auch bei höheren Glucosekonzentrationen gezeigt.

Da sich die Biomasse- und Produktkonzentration in einem kleinen Konzentrationsfenster glichen, war es notwendig, auf den Glycerinverbrauch und den Ertragskoeffizienten zu achten.



**Abbildung 3.10:** Einfluss der Glycerinkonzentration auf Glycerinverbrauch und Biomassebildung des *Microbacterium spec.*, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, Medium: SM1<sub>reduziert</sub> (Material und Methoden 2.3)

Die höchste Biomasseausbeute lag in einem Konzentrationsbereich von 20 g/l bis 25 g/l Glycerin (Abbildung 3.10). Das Glycerin wurde bis zu einer Konzentration von 10 g/l fast vollständig verstoffwechselt. Es folgte der Konzentrationsbereich von 15 g/l bis 25 g/l, in welchem der Verbrauch konstant blieb und bei einem Anteil von 60 % lag. Mit höheren Konzentrationen an Glycerin nahm der Verbrauch stetig ab.



Da alle Schüttelkolbenversuche nach der gleichen Kultivierungszeit abgebrochen wurden, lag der Ertragskoeffizient bei der Kultivierung mit 15 g/l mit 0,61 ein wenig höher als bei der Kultivierung mit 20 g/l Glycerin und einem Wert von 0,59. Mit diesen Resultaten würde für die nächsten Versuche eine Substratkonzentration von 15 g/l favorisiert werden, da bei dieser Konzentration das Verhältnis zwischen Biomassebildung und Glycerinverbrauch am günstigsten war.

### 3.2.7 Überprüfung weiterer Substrate

Es konnte gezeigt werden, dass Glycerin die Produktbildung beim *Microbacterium spec.* steigert. Ob dies jedoch durch das verbesserte Wachstum oder durch zusätzlich verfügbares Glycerin als Bestandteil des Glycoglycerolipides hervorgerufen wurde, ging aus den Resultaten bisher nicht hervor. Glucose und Mannose sind ebenfalls Bestandteil des Glycoglycerolipides und wurden vom Organismus gut verstoffwechselt. Zur Grundstruktur des Metaboliten gehören auch Fettsäuren, welche in den nächsten Versuchen als Substrate überprüft werden sollten. In der Tabelle 3.1 wurde veranschaulicht, ob überhaupt eine Verwertung der Komponenten auftritt.

**Tabelle 3.1:** Wachstum des *Microbacterium spec.* auf verschiedenen C-Quellen bei 30° C und SM1-reduziertem Medium (Material und Methoden 2.3)

Substrat	Wachstum
Distelöl	+/-
Rapsöl	+/-
Sojaöl	+/-
Sonnenblumenöl	+/-
Linolsäure	-
Sonnenblumenfettsäure	-
Ölsäure	-

+ gutes bis sehr gutes Wachstum, +/- mittleres Wachstum, - kein Wachstum

Hierbei zeigte sich, dass es bei den Fettsäuren zu keinerlei Wachstum kam, hingegen bei den pflanzlichen Ölen ein mittleres Wachstum vorhanden war. Die Steigerung der Biomasse- sowie Produktkonzentration trat im gleichen Maße wie bei gering eingesetzten Glycerinkonzentrationen auf. Auf eine graphische Darstellung wurde in diesem Fall verzichtet.

### 3.3 Bioreaktorkultivierungen zur Medienoptimierung

Um mit besser reproduzierbaren Bedingungen als im Schüttelkolben zu arbeiten, wurde im Anschluss ein Bioreaktor verwendet. Dieser bietet den Vorteil eines definierteren Sauerstoffeintrages und einer pH-Wert Regulierung. Weiterhin können on-line Daten wie der Sauerstoffpartialdruck sowie die Abgasdaten in Form von Sauerstoffverbrauchsrate und Kohlendioxidbildungsrate aufgezeichnet werden.

Da bei diesem Stamm nur wenige Daten zum Verhalten im Fermenter vorliegen, sollten zuerst als Grundlagen die verschiedenen Prozessparameter untersucht werden:

1. Einfluss des pH-Wertes
2. Einfluss des Natriumhydrogenphosphat auf die spezifische Wachstumsrate
3. Einfluss des Rührsystems (Scherkräfte) sowie Belüftungsrate
4. Spezifizierung des limitierenden Faktors
5. Möglichkeiten der Fed-Batch-Kultivierung als Vorstufe zur kontinuierlichen Kulturführung

#### 3.3.1 Batch-Kultivierungen

##### 3.3.1.1 Ausgangssituation

Die ersten Bioreaktorkultivierungen auf synthetischem Meerwasser (SM1) mit Glucose als zusätzlicher C-Quelle wurden mit und ohne Natriumhydrogenphosphat durchgeführt [Wicke et al. 2000]. Da das Anreichern des Mediums mit Phosphat zu besseren Ausbeuten bei der Biomasse und Produktbildung führte, wurden auch mit Glycerin als zusätzlicher C-Quelle zuerst diese beiden Kultivierungen gegenüber gestellt. Für eine Fermentation wurde das reduzierte Medium des SM1-Seewassers verwendet (Material und Methoden 2.3.2). Bei dem zweiten Versuch wurde außer dem Phosphat Ammonium zugesetzt, da sich durch dessen Einsatz die Niederschlagsmenge verringerte. Des Weiteren liefen die Bioreaktorkultivierungen unter einem konstanten pH-Wert von 7,5, was dem Startwert im Schüttelkolben entsprach. Die Belüftungsrate wurde ebenfalls von den ersten Versuchen mit

Glucose übernommen. Sie betrug 0,4 l/l·min. In der Tabelle 3.2 werden die Kultivierungsparameter und in der Tabelle 3.3 die wichtigsten Resultate der beiden Versuche zusammengefasst.

**Tabelle 3.2:** Kultivierungsparameter für das *Microbacterium spec.* im 10-l Bioreaktor

Parameter	Reaktor 1	Reaktor 2
Arbeitsvolumen	8 l	8 l
Temperatur	30 °C	30 °C
pH-Wert	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2
Belüftungsrate	0,4 l/l·min	0,4 l/l·min
C-Quelle	20 g/l Glycerin	20 g/l Glycerin
N-Quelle	5 g/l NH <sub>4</sub> Cl	-
P-Quelle	0,89 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-
Hefeextrakt	3,5 g/l	3,5 g/l
Bacto Pepton	3,5 g/l	3,5 g/l

**Tabelle 3.3:** Gegenüberstellung der Kultivierungsergebnisse des *Microbacterium spec.* mit und ohne Phosphatzusatz

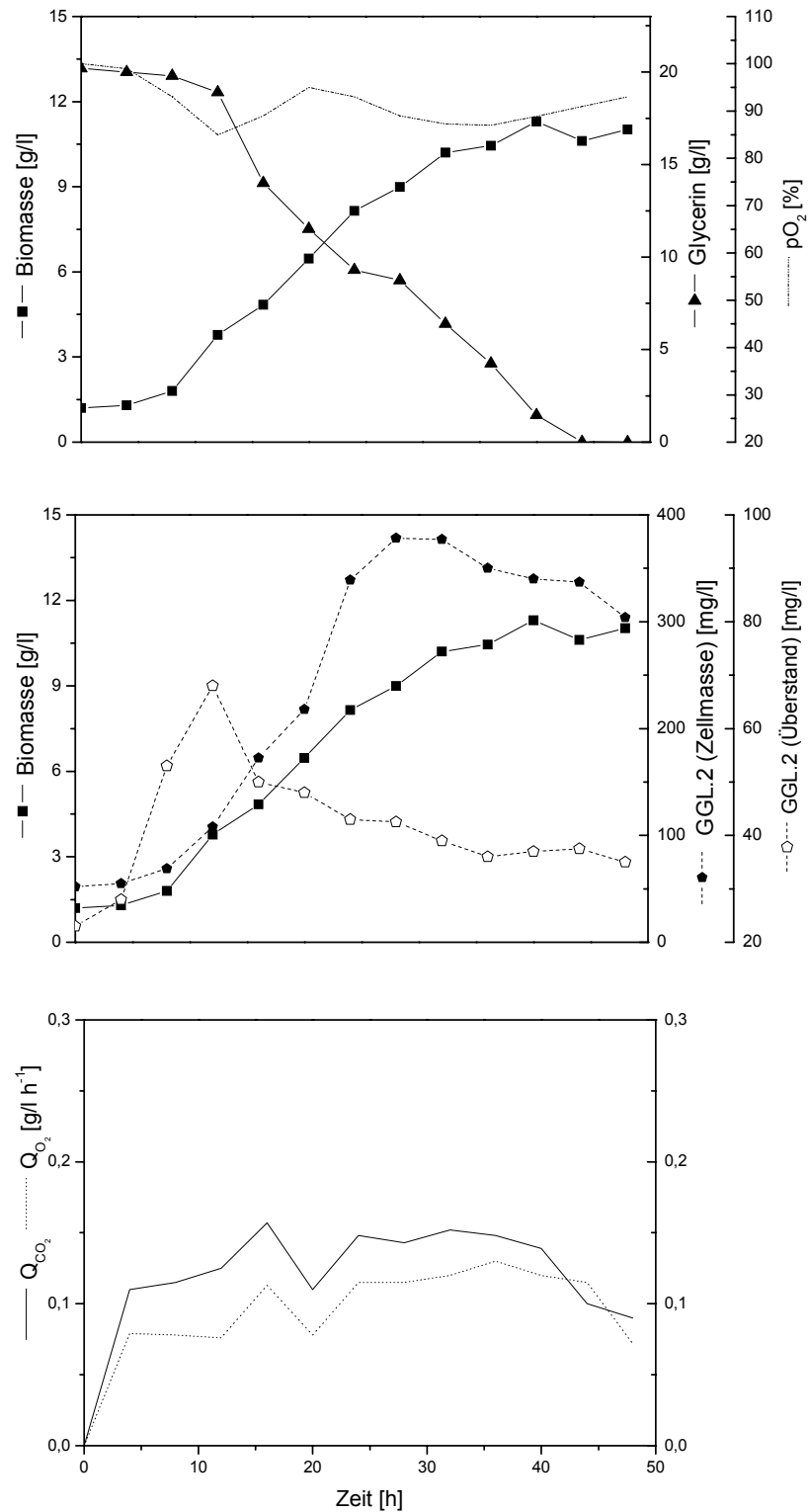
Prozessgröße	Reaktor 1	Reaktor 2
Kultivierungszeit	48,00 h	70,00 h
BTM <sub>max</sub>	10,50 g/l	8,50 g/l
GGL <sub>2max</sub>	360,60 mg/l	203,00 mg/l
P <sub>V</sub>	11,27 mg/(l·h)	3,30 mg/(l·h)
μ <sub>max</sub>	0,104 1/h	0,053 1/h
Y <sub>P/X</sub>	35,20 mg/g	26,80 mg/g
Y <sub>P/S</sub>	19,60 mg/g	13,50 mg/g

Der Verzicht auf Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> im Medium bewirkte demnach, wie bei der Kohlenstoffquelle Glucose, ein sehr viel langsames Wachstum. Dies wird durch die kleinere Wachstumsrate von 0,053 h<sup>-1</sup> gegenüber der von 0,104 h<sup>-1</sup> sehr deutlich.

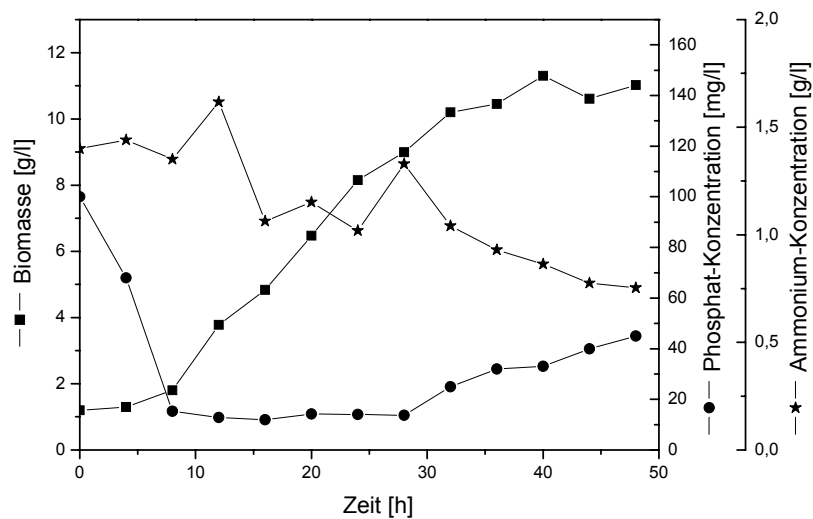
---

Des Weiteren sind kleine Unterschiede in der spezifischen Produktbildung und dem Produktertragskoeffizienten, sowie der maximalen Biomassekonzentration zu verzeichnen.

Für die anschauliche Darstellung des Verlaufes der Fermentation soll beispielhaft der Reaktor 2 gewählt werden. In den Abbildungen 3.11 und 3.12 sind alle relevanten Prozessgrößen über die Zeit aufgetragen.



**Abbildung 3.11:** Batch-Kultivierung von *Microbacterium spec.*: Darstellung vom Biomasse- Glycerin-, und Produktbildung sowie dem Sauerstoffpartialdruck, der Kohlendioxid-bildungsrate und Sauerstoffaufnahme, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 7,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer



**Abbildung 3.12:** Batch-Kultivierung von *Microbacterium spec.*: Darstellung vom Biomasse-, Phosphat-Ionen und Ammonium-Ionen Verlauf, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 7,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

Ausgehend vom Biotrockenmasseverlauf ist nach einer langen lag-Phase von 5 Stunden eine sehr kurze exponentielle Wachstumsphase zu vermuten. Dies passt zu den Daten des Sauerstoffpartialdruckes, welcher zum Zeitpunkt von 12 Stunden sein erstes Minimum erreicht hat. Es folgt der Bereich von 12 bis 30 Stunden mit linearem Wachstum, dem anschließend die Übergangsphase und nach 42 Stunden die Absterbe-Phase zuzuordnen ist. Dem Verlauf der Biotrockenmasse folgend wird dabei ein maximaler Wert von 10,5 g/l erreicht.

Es wurden maximale Glycoglycerolipidkonzentration von 360,6 mg/l in der Zellmasse und von 63 mg/l im Überstand detektiert. In der Zellmasse wurde das Produkt nach 32 Stunden abgebaut im Überstand nach 12 Stunden. Auf Grund der geringen Ausbeute des Produktes im Überstand wurde in den folgenden Versuchen auf die Darstellung verzichtet.

Der Glycerinabbau setzt verzögert nach einer Zeit von 10 Stunden ein. In dieser Zeit wurde, wie bereits erwähnt, beim  $pO_2$  das erste Minimum (12 h) durchschritten. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich schon zwei Gramm Biomasse gebildet, welche nicht auf den Verbrauch der zusätzlichen Kohlenstoffquelle (Glycerin) zurückgehen. Im Gegensatz zum Schüttelkolben wurde bei der Fermentation im Bioreaktor das Glycerin nach 45 Stunden vollständig abgebaut.

Parallel zur Biomassebildung stiegen die Sauerstoffaufnahme- und die Kohlendioxidbildungsrate an. Nach Erreichen des Maximums nach 12 Stunden wird dieser Wert gehalten.

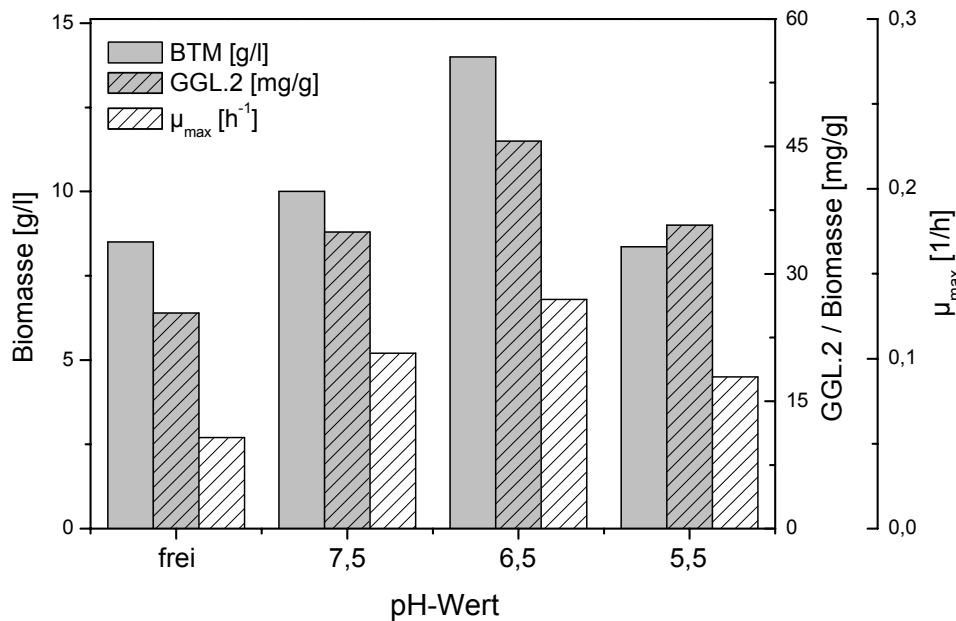
In der Abbildung 3.12 sind die Ammonium- und die Phosphat-Ionen-Konzentrationen über den gesamten Kultivierungsverlauf aufgetragen. Entgegen den Schüttelkolbenversuchen kommt es beim Ammonium zu einer Konzentrationserniedrigung. Die zugesetzte Menge verringert sich um ein Gramm. Das Phosphat wurde, wie erwartet, in den ersten Stunden abgebaut. In den Stunden danach blieb der Wert bis zum Zeitpunkt von 30 Stunden konstant, um dann wieder leicht anzusteigen.

Das Zusetzen von Phosphat zeigte einen positiven Einfluss auf die Kultivierung. Da im Gegensatz zum Schüttelkolben jedoch zwei Parameter geändert wurden, muss auch dem pH-Wert Aufmerksamkeit geschenkt werden. Welchen Einfluss dieser hat, soll in den nächsten Versuchen überprüft werden.

### **3.3.1.2 Einfluss des Initial pH-Wertes**

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Optima für Prozessgrößen wie Biotrockenmasse oder Produktbildung nicht immer im gleichen pH-Bereich liegen können [Wang 1995]. Beim Stamm *Microbacterium spec.* zeigten Schüttelkolbenversuche mit manueller pH-Korrektur, dass diese Prozessgröße einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung besitzt.





**Abbildung 3.13:** Einfluss des pH-Wertes auf Biomassebildung, spezifische Produktbildung und die spezifische Wachstumsrate des *Microbacterium spec.*, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

Die Bioreaktor-Kultivierungen mit konstantem pH-Wert wurden zum Zeitpunkt des Substratverbrauches abgebrochen. Bei der Kultivierung mit nicht geregeltem pH-Wert war dies nicht möglich, daher wurde diese Fermentation in der stationären Wachstumsphase beendet. Die Resultate zeigten, dass die besten Ergebnisse bei einem pH-Wert von 6,5 erreicht wurden (Abbildung 3.13). An dieser Stelle war nicht nur die größte Biomasse mit 14 g/l, sondern auch die höchste maximale spezifische Wachstumsrate von 0,137 h<sup>-1</sup> vorzufinden. Da die Produktivität von der jeweiligen Kultivierungszeit abhängig ist, wurden die fehlenden Daten zur maximalen Biomassebildung oder Produktbildung und die daraus resultierenden Ergebnisse noch einmal in der Tabelle 3.4 zusammengefasst. Trotz der längsten Kultivierungszeit von 70 Stunden war bei der Kultivierung mit dem niedrigsten pH-Wert von 5,5 die höchste Produktivität von 13,2 mg/l·h vorzufinden. Die Werte dieser Größe lagen jedoch nur um ein Milligramm auseinander, so dass der Unterschied vernachlässigbar war.

Ähnlich wie im Schüttelkolben zeigte sich, dass die Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle zu einer deutlichen Steigerung an Glycoglycerolipid führte. Mit der Änderung des pH-Wertes auf 6,5 konnte die Produktivität weiter gesteigert werden. Für weitere Kultivierungen ist daher mit dem pH-Wert von 6,5 weiter zu arbeiten.

**Tabelle 3.4:** Gegenüberstellung der Kultivierungsergebnisse des *Microbacterium* spec. bei verschiedenen pH-Werten, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin bzw. 20 g/l Glucose, Blattrührer

pH-Wert	BTM <sub>max</sub> [g/l]	GGL.2 <sub>max</sub> [mg/l]	P <sub>V</sub> [mg/l·h]	μ <sub>max</sub> [1/h]	Y <sub>P/X</sub> [mg/g]	Y <sub>P/S</sub> [mg/g]	Kultivierungszeit [h]
<u>35 l Kultivierung*:</u>							
7,5 <sub>Glukose</sub>	12,00	210	8,08	0,100	17,60	12,60	30,5
<u>8 l Kultivierungen:</u>							
7,5 <sub>Glukose</sub>	7,80	101	5,05	0,100	14,45	10,50	48,0
ungeregelt <sub>Glycerin</sub>	8,00	225	5,90	0,087	28,10	18,75	48,0**
7,5 <sub>Glycerin</sub>	10,50	360	11,27	0,104	35,20	19,60	48,0
<b>6,5<sub>Glycerin</sub></b>	<b>14,00</b>	<b>522</b>	<b>11,80</b>	<b>0,137</b>	<b>46,00</b>	<b>30,10</b>	<b>54,0</b>
5,5 <sub>Glycerin</sub>	8,30	325	13,20	0,086	33,00	28,70	70,0

\* Vergleichskultivierung [Wicke et.al.1999]

\*\* Substrat wurde nicht vollständig verbraucht

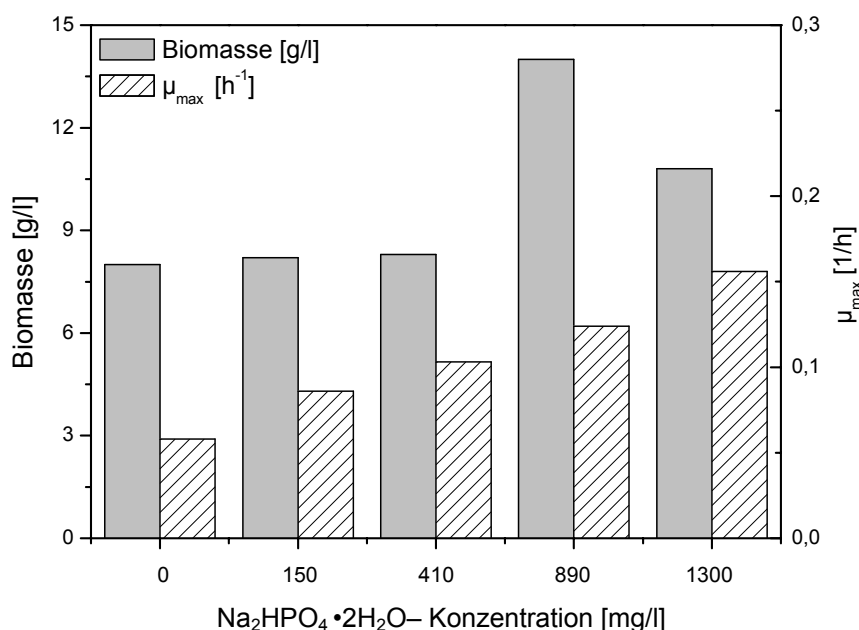
Y<sub>P/S</sub> ist nur auf den Verbrauch des Glycerins bezogen

### 3.3.1.3 Einfluss der zugesetzten Natriumhydrogenphosphat-Menge

Phosphat wird von den Zellen primär für die Synthese von Nucleinsäuren und Phospholipiden verwendet [Madigan et al. 2000].

Durch den Vergleich der beiden Kultivierungen in der Ausgangssituation wurde der Unterschied zwischen einer Kultivierung mit- und ohne- Phosphatzusatz sehr deutlich. In den Kultivierungen mit variierenden pH-Werten wurde jeweils eine Natriumhydrogenkonzentration von 890 mg/l eingesetzt. Es war jedoch anzunehmen, dass durch die unterschiedlichen pH-Werte (z.B. 7,5, 5,5) der Gehalte an löslichem Phosphat variierte (Niederschlag:  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \downarrow$ ), so dass auch bei diesen Kultivierungen unterschiedliche Phosphatgehalte die Ursache für das verbesserte Wachstum sein konnten.

In den nächsten Kultivierungen wurde somit die Abhängigkeit des Wachstums des *Microbacterium spec.* gegenüber der Phosphat-Konzentration näher untersucht. Das Resultat ist graphisch in der Abbildung 3.14 und tabellarisch in der Tabelle 3.5 dargestellt.



**Abbildung 3.14:** Einfluss der zugesetzten Natriumhydrogenphosphat-Konzentration auf Biomassebildung und die spezifische Wachstumsrate des *Microbacterium spec.*, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 ohne 890 mg/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

In diesem Fall wurden die maximale Biomasse-Konzentration und die maximale spezifische Wachstumsrate aufgetragen. Nach einer anfänglichen Konstanz der Werte für die Biomasse zeigte diese eine deutliche Steigerung beim Einsatz einer Natriumhydrogenphosphat-Menge von 890 mg/l. Der Wert stieg von 8 g/l Biotrockenmasse auf 14 g/l. Durch eine weitere Erhöhung der Konzentration sank der Wert für die Zellmasse auf 10,8 g/l. Das Profil für die spezifische Wachstumsrate wies in dem abgebildeten Bereich kein Maximum auf. Sie stieg mit zunehmender Phosphat-Konzentration an. In den ersten Bereichen von 0 bis 410 mg/l Natriumhydrogenphosphat blieb die Biomasse konstant, während die Wachstumsrate anstieg. Der Produktertragskoeffizient steigt ebenfalls in diesem Bereich. Beginnend mit 19,7 mg/g steigerte sich dieser bei einer Konzentration von 410 mg/l Natriumhydrogenphosphat auf den Wert von 23 mg/g. Ab dieser Konzentration wurde

auch erstmals über den gesamten Kultivierungszeitraum die Menge an Substrat (20g/l Glycerin) vollständig aufgebraucht. Das Maximum für den Produkt-ertragskoeffizienten lag wie bei der Biotrockenmasse bei 890 mg/l Phosphat. Bei einer eingesetzten Menge von 1,3 g/l Natriumhydrogenphosphat wurde damit die größte Wachstumsrate festgestellt, jedoch nicht die höchste Biomassekonzentration. Da das Glycolipid überwiegend zellgebunden vorliegt, wurde bei der maximalen Biomasse von 14 g/l, einem pH-Wert von 6,5 und einem Phosphatgehalt von 890 mg/l weitergearbeitet.

**Tabelle 3.5:** Gegenüberstellung der Kultivierungsergebnisse des *Microbacterium spec.* bei unterschiedlichen Gehalten an Natriumhydrogenphosphat, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 ohne 890 mg/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Biomasse	GGL.2 <sub>max</sub>	P <sub>V</sub>	μ <sub>max</sub>	Y <sub>P/X</sub>	Y <sub>P/S</sub>	Kultivie- rungszeit
[mg/l]	[g/l]	[mg/l]	[mg/lh]	[1/h]	[mg/g]	[mg/g]	[h]
ohne PO <sub>4</sub>	8,00	205	3,60	0,058	26,8	19,7	70**
150	8,20	230	4,10	0,080	46,0	20,0	68**
410	8,25	340	6,80	0,109	46,0	23,0	60
890	14,00	522	11,80	0,137	46,0	30,1	54
1300	10,80	420	8,75	0,170	46,0	28,0	55

\*\* Substrat wurde nicht vollständig verbraucht

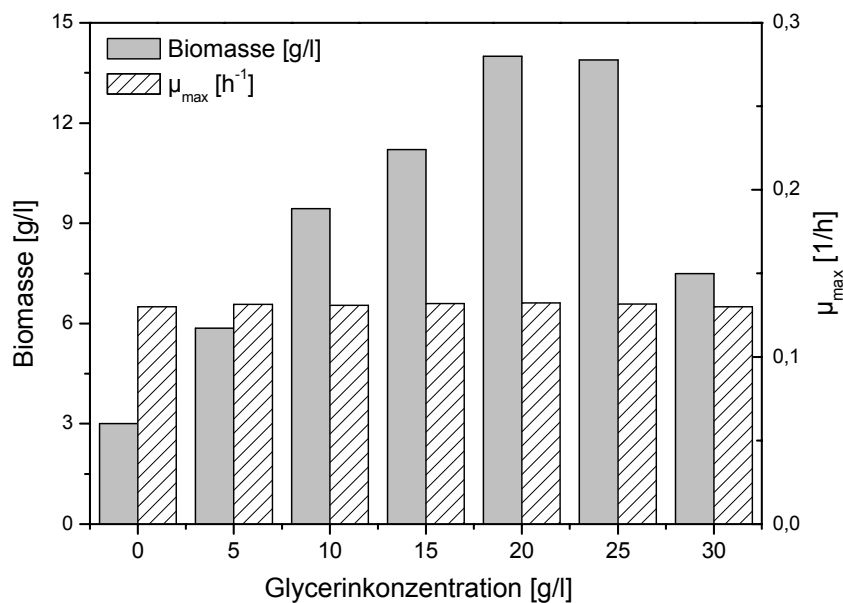
Die Menge an zugesetztem Phosphat wurde in keiner der Kultivierungen vollständig verbraucht. Am Anfang einer jeden Fermentation wurde (0 – 15 Stunden) eine starke Reduktion des Phosphates beobachtet. Danach folgte ein konstanter Bereich und abschließend eine Zunahme der Phosphatwerte (Abbildung 3.12). Als limitierender Faktor während der Fermentation kommt das Phosphat damit nicht in Frage.

### 3.3.1.4 Einfluss der Glycerin – Konzentration

Eine weitere grundlegende Prozessgröße ist der Glyceringehalt. Das Glycerin sollte bei den Kultivierungen als Hauptkohlenstoffquelle dienen. In den Schüttelkolben-experimenten dieser Arbeit zeigte sich, dass schon kleine Mengen an Glycerin die Produktausbeute steigern können. In dem Konzentrationsbereich von 0 bis 15 g/l

Glycerin gab es eine direkte Abhängigkeit zur Biotrockenmasse, welche sich in einem linearen Zusammenhang widerspiegelte.

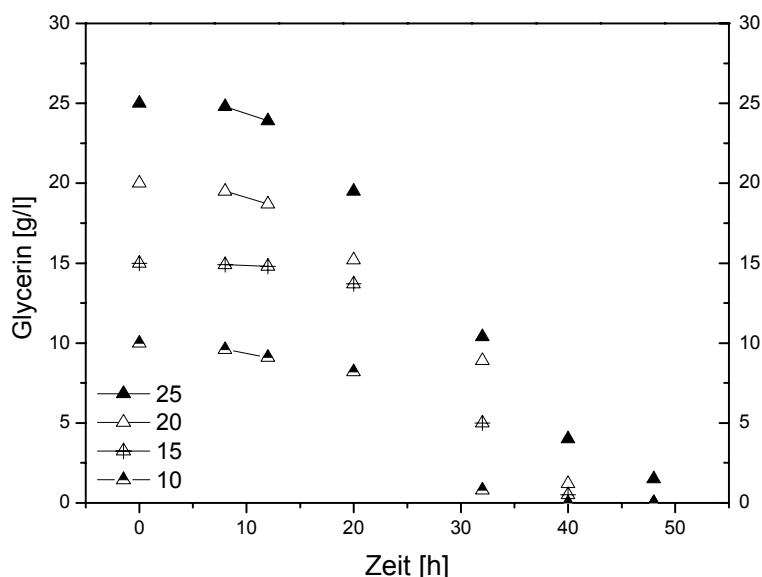
Nach einer Zugabe von 20 g/l Glycerin wurde das Maximum der Biomassebildung erreicht. Bei weiterer Erhöhung der Glycerin-Konzentration gingen die Werte für die Biomasse jedoch zurück. Da in den Schüttelkolben eine Begrenzung des Wachstums durch Sauerstofflimitation vorliegen konnte, wäre im Bioreaktor ein anderer Verlauf bezüglich des Wachstums zu erwarten. Es sind daher Kultivierungen mit wechselnder Glycerinkonzentration durchgeführt worden. Die ermittelten Werte für die Biomasse und die spezifische Wachstumsrate wurden in der Abbildung 3.15 und der Tabelle 3.6 dargestellt.



**Abbildung 3.15:** Einfluss der zugesetzten Glycerin-Konzentration auf Biomassebildung und die spezifische Wachstumsrate des *Microbacterium spec.*, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle: Glycerin, Blattrührer

Es wurde angenommen, dass sich die maximale spezifische Wachstumsrate mit variierender Glycerinkonzentration ändern würde. Ähnlich wie bei den Schüttelkolbenkultivierungen ist deutlich ein linearer Anstieg der Biotrockenmasse mit zunehmender Glycerinkonzentration zu beobachten. Erst bei einer Konzentration von 30 g/l Glycerin nahmen die Werte für die Biomasse ab. Zusätzlich wurde bei dieser Konzentration kein vollständiger Abbau der Kohlenstoffquelle beobachtet. Entgegen der Vermutung, dass die Änderung der Glycerinkonzentration eine Auswirkung auf die maximale spezifische Wachstumsrate haben würde, blieb diese konstant.

Auffällig bei den Kultivierungen war ebenfalls der Abbau des Glycerins über der Zeit. In der Abbildung 3.16 sind verschiedene Konzentrationsverläufe graphisch dargestellt.



**Abbildung 3.16:** Einfluss der zugesetzten Glycerin-Konzentration (10 – 25 g/l) auf den Glycerinabbau des *Microbacterium spec.*, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle: Glycerin, Blattrührer

Abgebildet sind die Verläufe mit den Konzentrationen von 10, 15, 20 und 25 g/l Glycerin im Medium. Wie zuvor erwähnt wurde, wird das Glycerin anfänglich nicht oder nur in sehr geringem Maße abgebaut. Diese Startphase umfasst den Zeitraum von 0 bis 15 Stunden. Nach diesem Intervall folgte ein linearer Bereich, in welchem das Substrat stark reduziert wurde. Die negativen Steigungen dieser Bereiche scheinen bei allen eingesetzten Glycerinkonzentrationen gleich zu sein, was zu einer konstanten Glycerinverbrauchsrate führen würde. Durch die unterschiedlichen Kultivierungszeiten und das Eintreten in die stationäre Phase, welche bis zu einer Konzentration von 25 g/l mit dem Verbrauch an Glycerin verbunden waren, liegen auch unterschiedliche Resultate bezüglich des Produktertragsfaktors vor. Dieser betrug bei den Konzentrationen von 15 bis 25 g/l Glycerin ungefähr 30 mg/g. In diesem Bereich liegen die Produktivitäten sehr dicht beieinander (Tabelle 3.6). Da die spezifische Produktbildung für diesen Abschnitt konstant war, wurde als Bewertung für weitere Versuche die Biotrockenmasse verwendet. Da der Ertragskoeffizient von 0,7 bei der Kultivierung bei 20 g/l Glycerin günstiger war als der von 0,56 unter der

Verwendung von 25 g/l Glycerin, wurde diese Konzentration für weitere Kultivierungen beibehalten. Ein Hinweis auf die limitierende Größe innerhalb des Systems wurde an dieser Stelle noch nicht gegeben.

**Tabelle 3.6:** Gegenüberstellung der Kultivierungsergebnisse des *Microbacterium spec.* bei unterschiedlichen Glyceringehalten, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle Glycerin, Blattrührer

Glycerin- konzentration [g/l]	Biomasse [g/l]	GGL.2 <sub>max</sub> [mg/l]	P <sub>V</sub> [mg/lh]	μ <sub>max</sub> [1/h]	Y <sub>P/X</sub> [mg/g]	Y <sub>P/S</sub> [mg/g]	Kultivie- rungszeit [h]
0	3,0	54	4,2	0,12	19,2	-	30
5	5,8	125	4,4	0,13	31,2	26,0	38
10	9,4	245	7,6	0,13	30,6	27,2	44
15	11,2	410	9,7	0,13	46,0	29,0	48
20	14,0	522	11,8	0,14	46,0	30,1	54
25	13,8	510	11,5	0,13	46,0	26,1	54
30	7,5	268	7,1	0,13	46,0	25,5	54**

\*\* Substrat wurde nicht vollständig verbraucht

### 3.3.1.5 Einfluss des Volumenbezogenen Leistungseintrages

Die Wirksamkeit eines Rührers wird durch seine Geometrie, die Geschwindigkeit seiner Bewegung und die Form seines begrenzenden Behälters beeinflusst. Zusätzlich spielt die Begasung eine wichtige Rolle, da diese neben dem Sauerstoffeintrag einen wesentlichen Einfluss auf den Wärme- und Stoffübergang ausübt.

In den Voruntersuchungen von Wicke wurde auf den Einfluss des Rührsystems hingewiesen. Es traten Wachstumsunterschiede zwischen einem Umwurfrührsystem und einem Blattrührsystem auf. In technischer Hinsicht beziehen sich die Unterschiede zwischen den beiden Rührsystemen auf beispielsweise differente Strömungsprofile. Der Umwurfrührreaktor zeichnet sich durch ein tangentiales, scherarmes Strömungsprofil aus, weiterhin wird die Verweilzeit des in die Flüssigkeit eingetragenen Sauerstoffes erhöht. Gegensätzlich zum tangentialen Strömungsprofil wird durch den Blattrührer ein axiales, turbulentes Strömungsfeld erzeugt, wodurch die Scherung, die auf die Partikel wirkt, erhöht wird.

Marine Organismen können ebenfalls entsprechend ihres Habitates an unterschiedliche Strömungsverhältnisse angepasst sein, so dass Scherstress negative oder positive Auswirkungen auf den Stoffwechsel des Organismus haben kann.

In allen bisherigen Versuchen dieser Arbeit wurde mit einem Blattrührsystem fermentiert. In den folgenden Fermentationen ist daher der Aspekt Rührsystem und Begasungsrate untersucht worden. Die Resultate sind in Tabelle 3.7 festgehalten.

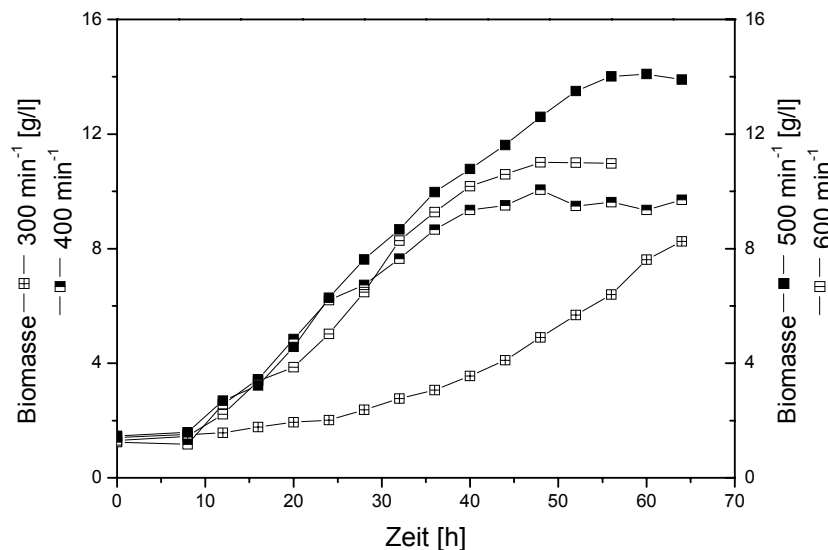
Vergleicht man die Werte der einzelnen Versuche, wird sehr schnell deutlich, dass die Versuche mit dem Umwurfrührsystem eine wesentlich längere Kultivierungszeit benötigten als die Fermentationen mit dem Blattrührsystem. Es war deutlich zu erkennen, dass mit zunehmendem Energieeintrag die Fermentationszeit sinkt und nach Erreichen eines Maximums stagniert. Die Biomasseverläufe für die Fermentationen mit den Drehzahlen 300, 400, 500 und 600  $\text{min}^{-1}$  sind in der Abbildung 3.17 dargestellt.

**Tabelle 3.7:** Gegenüberstellung der Kultivierungsergebnisse des *Microbacterium spec.* bei variierendem volumenbezogenem Leistungseintrag, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

Arbeits- Volumen 8 l	n [ $\text{min}^{-1}$ ]	F [l/l·min]	BTM [g/l]	GGL.2 <sub>max</sub> [mg/l]	Y <sub>P/X</sub> [mg/g]	Kultivie- rungszeit [h]
<u>C-Quelle: Glucose</u>						
Umwurf	800	0,4	10,6	186	17,1	86
Blattrührer	500	0,4	8,8	112	14,2	40
<u>C-Quelle: Glycerin</u>						
Umwurf	800	0,4	12,3	432	36,3	68
Blattrührer	700	0,2	11,2	292	35,2	53
Blattrührer	600	0,4	10,9	326	34,9	53
Blattrührer	500	0,4	14,0	522	46,0	53
Blattrührer	400	0,4	10,1	510	46,0	52
Blattrührer	300	0,6	9,1	421	35,0	70



Es wurde deutlich, dass der Biomasseverlauf mit der Drehzahl von  $300 \text{ min}^{-1}$  und der Begasungsrate von  $0,6 \text{ l/l} \cdot \text{min}$  eine sehr lange lag-Phase besitzt und auch nach 60 Stunden nicht die stationäre Phase erreicht hat. Durch die Erhöhung des volumenbezogenen Leistungseintrages verkürzte sich die lag-Phase.



**Abbildung 3.17:** Einfluss des volumenbezogenen Leistungseintrages auf die Biomassebildung des *Microbacterium spec.*, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l,  $30^\circ\text{C}$ ,  $0,4 \text{ l/l} \cdot \text{min}$  ( $300 \text{ min}^{-1}$ :  $0,6 \text{ l/l} \cdot \text{min}$ ), pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

Bei einem Vergleich dieser Fermentation mit dem einer Drehzahl von  $500 \text{ min}^{-1}$  und einer Begasungsrate von  $0,4 \text{ l/l} \cdot \text{min}$  wird deutlich, dass der Energieeintrag nicht ausreichend war. Durch eine weitere Steigerung dieser Größe (volumenbezogener Leistungseintrag:  $500 \text{ min}^{-1}$ ,  $0,4 \text{ l/l} \cdot \text{min}$ ) konnte jedoch kein besseres Resultat erzielt werden. Die lag-Phasen und die exponentielle Phasen glichen sich. Unterschiede gab es in der maximalen Biomasseproduktion. Diese war bei höherer Drehzahl ( $600 \text{ min}^{-1}$ ) geringer.

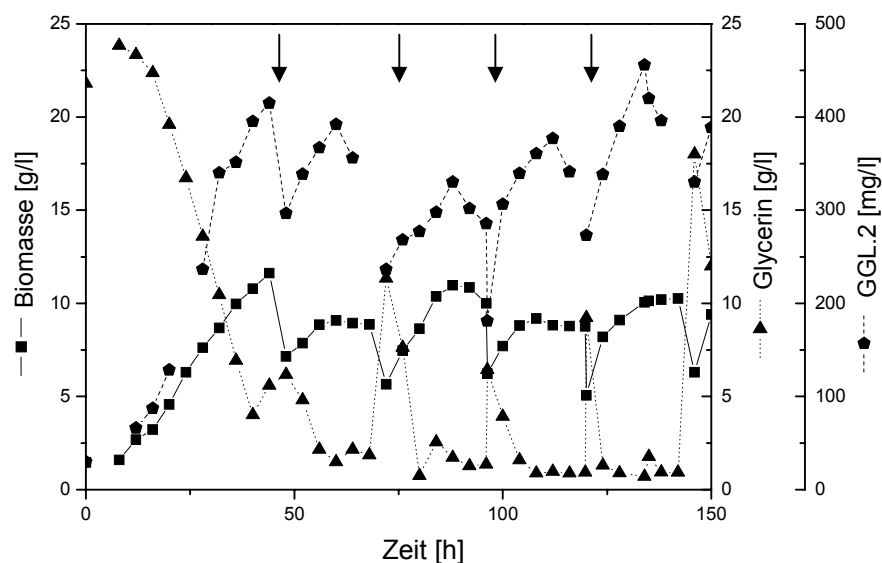
Nach diesen Kultivierungen zeigte sich, dass der Drehzahlbereich von  $500 \text{ min}^{-1}$  und die Begasungsrate von  $0,4 \text{ l/l} \cdot \text{min}$  am besten geeignet ist. Der limitierende Faktor konnte bei diesen Versuchen nicht ermittelt werden.

### 3.3.1.6 Repeated Batch-Fermentation

Bei einer Fed-Batch Kultur werden Anteile der Kulturlösung (z.B. C-Quelle) der wachsenden Kultur zugesetzt, jedoch entgegen der kontinuierlichen Kultur bis zur

Beendigung der Fermentation nichts aus dieser entnommen. Beim Glycerin trat eine Konzentrationsabhängigkeit zwischen dem zugesetzten Glycerin und der Biomasse auf. Die Kohlenstoffquelle wurde jedoch in höheren Konzentrationen nicht vollständig abgebaut. Da das Substrat in diesem Fall im Überschuss vorgelegen haben könnte, wurde mit dem Fed-Batch Verfahren versucht die C-Quelle nach ihrem Abbau zu erneuern. Auf die Darstellung dieses Versuches wurde verzichtet, da es beim Zusetzen des Glycerins weder zu einer Biomasse-Anreicherung noch zu deren Erhalt kam.

Ohne die Kenntnis des limitierenden Faktors in dem System wurde versucht, ähnlich einem repeated Batch-Versuch, dem Fermenter frische Kulturlösung zuzusetzen, während ein Teil der vorherigen Kultur als Inokulum verbleibt. Die Zeitpunkte, an denen Medium zudosiert wurde sind, durch Pfeile gekennzeichnet (Abbildung 3.18). In diesem Versuch wurde nur die Standardnährlösung (SM1-Medium: Material und Methoden 2.3) getauscht und auf die Änderung der einzelnen Parameter geachtet.



**Abbildung 3.18:** Repeated Batch-Fermentation des *Microbacterium* spec., Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, Austauschvolumen 4 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle Glycerin, Blattrührer

Nach dem Zusetzen des Mediums wurden folgende Veränderungen festgestellt (Abbildung 3.18). In den ersten 40 Stunden ist der typische Verlauf einer Batch-Kultivierung dargestellt, welche noch vor Erreichen der stationären Phase abgebrochen wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde zum ersten Mal Nährlösung, welche

5 g/l Glycerin enthielt, zugesetzt. Da das Glycerin bis auf 4 g/l verbraucht war, konnte durch den Zusatz der Nährlösung nur ein kleiner Anstieg der Konzentration auf 7,5 g/l erzielt werden. Trotz der geringen Konzentration der Kohlenstoffquelle ist ein sofortiger Zuwachs der Biomasse zu beobachten. Diese stieg in den ersten 10 Stunden von 6,5 g/l auf 9 g/l fast linear an. In dieser Phase wurde ebenfalls das Glycerin bis auf ein Minimum von 0,9 g/l abgebaut. Es folgt ein stationärer Bereich, in welchem die Biomassekonzentration gehalten und auch das Glycerin nicht weiter abgebaut wurde.

Mit dem Eintritt in die stationäre Phase war zuvor stets ein Abbau des Produktes verbunden, ein Tatbestand der auch während dieser Fermentation erfüllt wurde. Mit dem zweiten Zusetzen an Kulturbrühe wurde die Glycerinkonzentration erhöht und in einer Konzentration von 20 g/l zugeführt. Da die Hälfte des Fermentationsvolumens durch frische Nährlösung ersetzt wurde, ist der Glyceringehalt insgesamt um 10 g/l gestiegen. Wie zuvor ist durch das Zusetzen von frischem Medium ein sofortiger Anstieg der Biomasse und des Produktes zu verzeichnen. Die Biomasse erfährt im gleichen Zeitraum von 10 Stunden eine Zunahme von 5,5 g/l auf 12 g/l Trockenmasse. Da in dieser Zeit auch ein stetige Zunahme des Produktes von 250 mg/l auf 350 mg/l Glycoglycerolipid erfolgte, trat im Gegensatz zur ersten Medienzufuhr eine Verdoppelung der Produktivität auf. Nach einer kurzen stationären Phase folgte in diesem Fermentationsabschnitt die letale Phase, welche durch die Abnahme der Biotrockenmasse gekennzeichnet war. Auch in diesem Teilabschnitt war mit der Beendigung der Wachstumsphase ein Abbau des Produktes verbunden. Beim dritten Versuch des Medienwechsels wurde der erste Versuch wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Trotz einer geringeren Startbiotrockenmasse wurde nach einer kurzen Wachstumsphase der beim ersten Lauf erzielte Wert von 9 g/l Biomasse erreicht, dem sich folgend eine ausgeprägte stationäre Phase anschloss. Allen bisherigen Versuchen gemeinsam war der sofortige und schnelle Abbau an Glycerin. Auch der zweite Versuch wurde der Reproduzierbarkeit wegen wiederholt und zeigte die gleichen Merkmale. Die Biomasse erlangte einen Maximalwert von 12 g/l und nach Erreichen dieses Wertes reduzierte sich die Produktausbeute schnell. Mit dem Ersetzen des Mediums durch frische Kulturbrühe wurde mit einer scheinbaren Verdünnungsrate von  $0,025 \text{ h}^{-1}$  gearbeitet.

Hinsichtlich einer optimalen Ausnutzung der Produktbildung müsste in den nächsten Versuchen verhindert werden, dass die Zellen in die Stationäre Phase übergehen und eine Spezifikation des limitierenden Faktors wäre erforderlich.

### 3.3.1.7 Kontinuierliche Kultivierung

Für eine erfolgreiche verfahrenstechnische Optimierung mikrobieller Prozesse ist eine Kultivierung mit kontinuierlicher Kulturführung unerlässlich. Die Kultur wird bei gleich bleibender Substratkonzentration unter konstanten Milieubedingungen in der Übergangsphase zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase gehalten. Diese Art der Kulturführung bietet weiterhin den Vorteil, eine biologische Größe ( $\mu$ ) durch eine physikalische Größe ( $D$ ) einstellen zu können und die metabolische Regulation unter konstanten physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

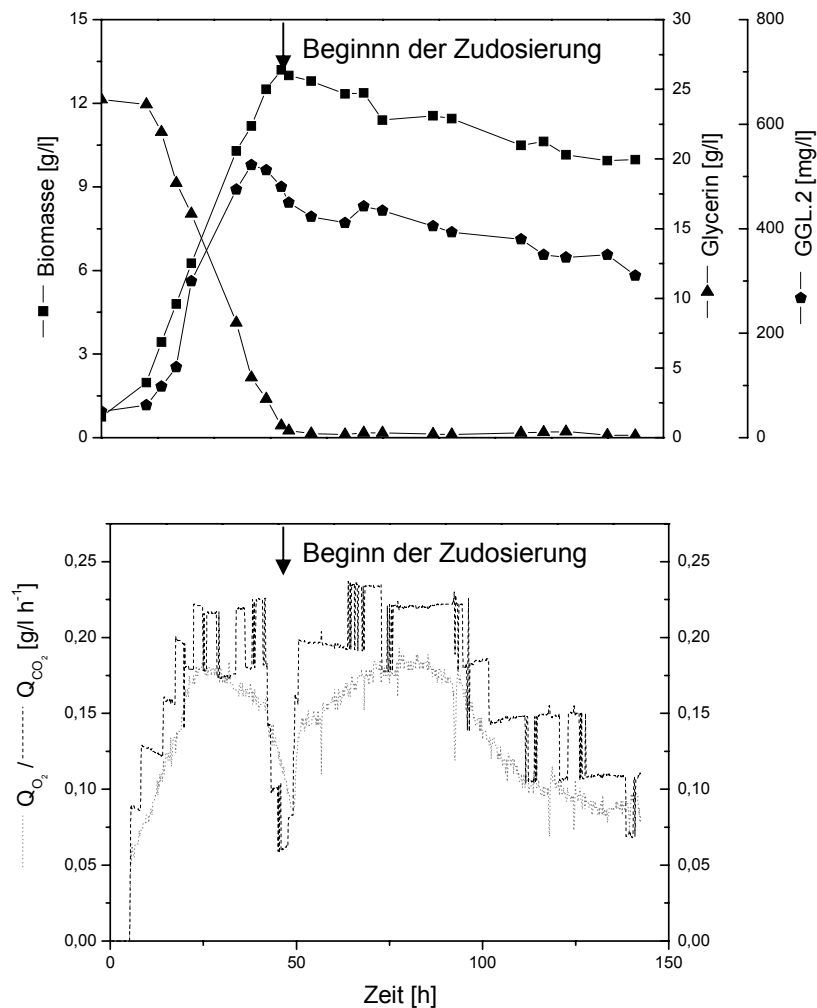
Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch Unklarheit über den limitierenden Faktor herrschte, wurde durch das Einstellen einer sehr geringen Fließrate eine Glycerinlimitation vorgegeben. Auf diese Weise sollte der Einfluss auf die Produktivität, sowie auf die anderen Prozessgrößen überprüft werden.

Die ersten 50 Stunden sollen an dieser Stelle unkommentiert bleiben, da es sich hierbei um den Standard Batch-Prozess handelt, der schon ausführlich in dem vorherigen Kapitel erläutert wurde. Darauf folgend wurde bei diesem Prozess eine Fließrate von  $0,04 \text{ h}^{-1}$  eingestellt (SM1-Medium: Material und Methoden 2.3.2). Betrachtet man den Verlauf der Biotrockenmasse ist zu beobachten (Abbildung 3.19), dass sie stetig in den ersten 50 Stunden abnimmt. In der verbleibenden Zeit strebt diese jedoch einem konstanten Wert entgegen. Er entspricht einer Biotrockenmasse von  $9 \text{ g/l}$ . In dieser Phase betrug die Glycerinkonzentration  $0,5 \text{ g/l}$  und konnte zu diesem Zeitpunkt limitierend auf das System wirken. Die Produktivität war in dem Bereich abnehmend.

Die Abgasdaten einer jeden Kultivierung lassen ebenfalls Schlüsse auf das Verhalten der Kultur zu (Abbildung 3.19). Wie zu erwarten stieg der  $Q_{\text{CO}_2}$  in der Batch-Kultivierung auf einen maximalen Wert an. An dieser Stelle wird das exponentielle Wachstum eingestellt und die Kultur wechselt in die Übergangsphase. Entgegen vielen anderen Kultivierungen wird dieser Wert gehalten und erst nach einer

Zeitspanne von 15 Stunden langsam abgebaut. Mit dem Beginn des Zusetzens an frischem Medium stieg der Gehalt des  $Q_{CO_2}$  wieder an, um nach 100 Stunden langsam wieder abzunehmen.

Für eine optimale kontinuierliche Kultivierung bei der mit einer niedrigen Zuflussrate eine höhere Zelldichte gehalten werden kann, müssen noch mehr Daten über die Wachstumsparameter vorliegen.

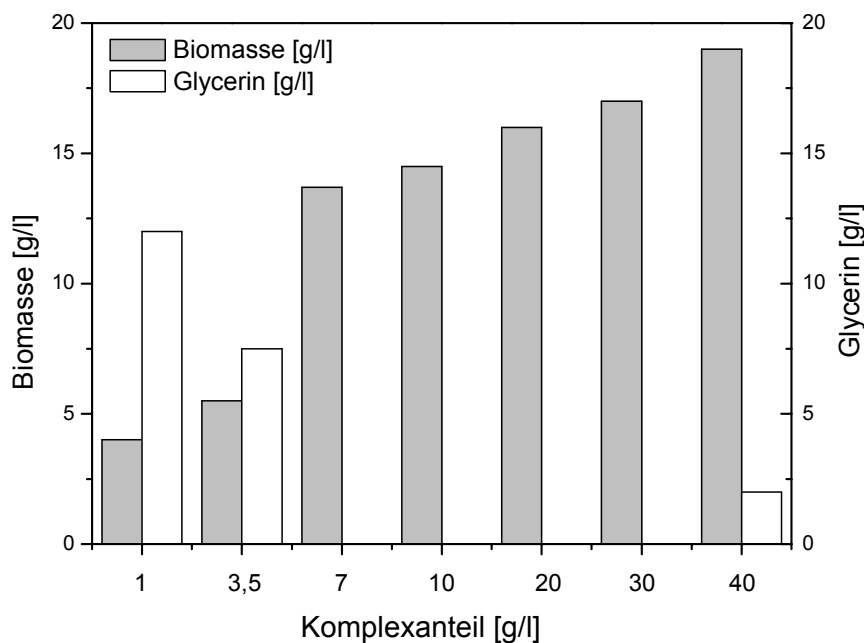


**Abbildung 3.19:** Kontinuierliche Fermentation des *Microbacterium spec.*, Medienzufuhr mit  $D = 0,04 h^{-1}$   
 Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium  
 (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20 g/l Glycerin, Blattrührer

Trotz abnehmender Biomasse wurde am Anfang der Zudosierung ein Anstieg der Abgasdaten wahrgenommen. Das Profil, welches sich im  $Q_{CO_2}$  Gehalt zeigte, ähnelte dem einer Batch-Kultivierung. Der  $Q_{CO_2}$  stieg bis zu einem Maximalwert und nahm dann langsam wieder ab, jedoch nicht bis auf den Wert von Null, sondern bis zu einem konstanten Wert von 0,075 g/lh<sup>-1</sup>.

### 3.3.1.8 Einfluss des Komplexanteils auf die Kultivierung

Der Komplexanteil ist die letzte Prozessgröße, welche innerhalb dieses Systems überprüft werden soll. Dieser wurde in Form von Hefeextrakt und Bacto Pepton zugesetzt (Bacto Pepton/Hefeextrakt: 1/1). Das Verhältnis von 1/1 der beiden Komponenten zueinander erwies sich als vorteilhaft, daher wurde bei den folgenden Fermentationen nur die Gesamtmenge an Komplexanteil erhöht, nicht jedoch das Verhältnis geändert. In der folgenden Abbildung 3.20 sind die maximalen Biomassen und die Restgehalte an Glycerin am Ende der Fermentation angegeben.



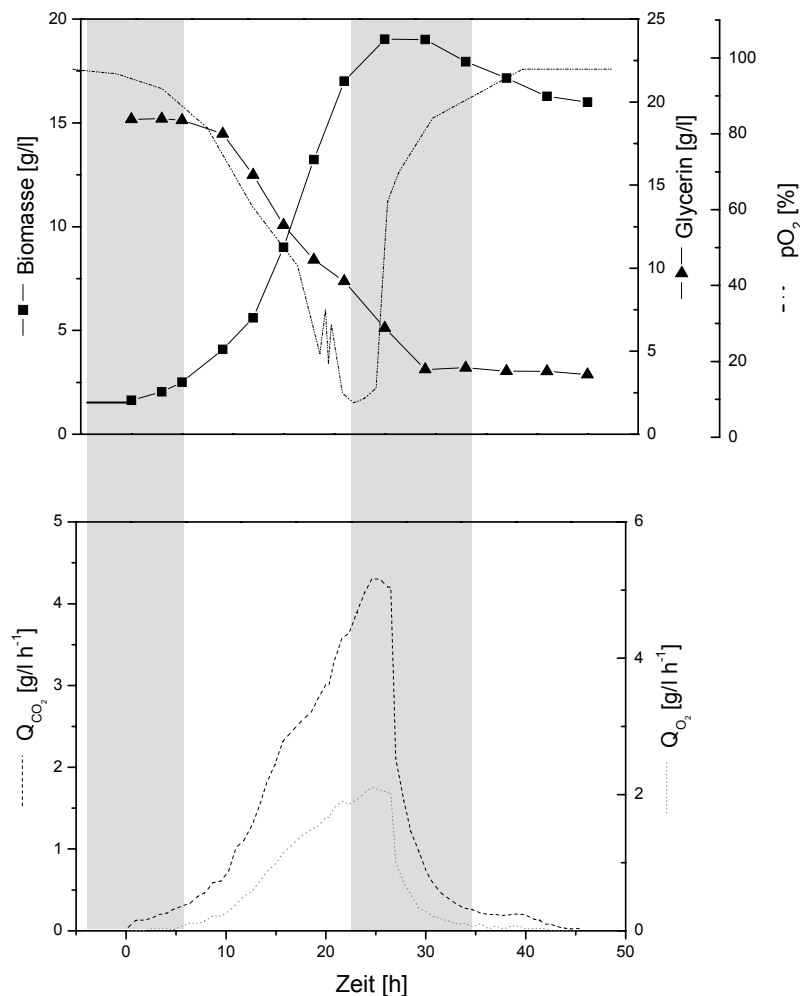
**Abbildung 3.20:** Einfluss des Komplexanteils (Bacto Pepton/Hefeextrakt: 1/1; z.B. 3,5 = 1,75 + 1,75) auf die Biomassebildung und den Glycerinverbrauch des *Microbacterium spec.*, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 ohne Hefeextrakt und Bacto Pepton), C-Quelle: 20g/l Glycerin, Blattrührer

Es konnte ein deutlicher Sprung in der Biomassebildung zwischen den Konzentrationen 3,5 und 7 g/l Komplexanteil festgestellt werden (Abbildung 3.20). Das Glycerin wurde in den geringeren Konzentrationsbereichen nicht vollständig abgebaut. Dieses Phänomen trat allerdings auch bei einer wesentlich höheren Konzentration an Komplexanteil auf. Gegensätzlich zu den Versuchen mit zunehmender Glycerinkonzentration, wurde bei diesen Kultivierungen eine Änderung

der spezifischen Wachstumsrate festgestellt. Diese nahm mit steigender Komplexkonzentration zu. In höheren Konzentrationsbereichen kam es zur Stagnation dieser Größe. Da es sehr schwierig ist den Verbrauch an Komplexanteil mengenmäßig zu erfassen, wurden die in ihm enthaltenen Bestandteile über die Zeit vermessen. Die vom Hersteller angegebenen Inhaltsstoffe sind Vitamine, Spurenelemente und Aminosäuren (Diskussion 4.2). Da der Gehalt letzterer 30 Prozent von der eingesetzten Gesamtmenge an Komplexanteil beträgt, wurden diese mittels HPLC vermessen. Bei einer Einwaage von 7 g/l Komplex wären 2,1 g/l an freien Aminosäuren zu erwarten. Diese 2,1 g/l müssen auf die 20 Aminosäuren verteilt werden, so dass pro Aminosäure Werte im mg-Bereich erwartet werden können. In diesem Zusammenhang wurden Kultivierungen mit unterschiedlichen Komplexanteilen vermessen. Für eine schematische Darstellung des Abbaus der Aminosäuren über die Zeit wurde beispielhaft eine Fermentation mit 40 g/l Komplexanteil gewählt. Auf Grund der hohen Konzentration von Hefeextrakt und Bacto Pepton erhöhte sich ebenfalls der Anteil der Aminosäuren, welche nun im g/l-Bereich einfacher über die Zeit beobachtet werden konnten.

In der Abbildung 3.21 sind die Daten von Biomasse, Glycerin und dem Sauerstoffpartialdruck enthalten. Die Daten des  $pO_2$  stehen in Verbindung mit den Daten der Abgasanalyse, welche Auskunft über die Kohlendioxidbildungsrate und die Sauerstoffaufnahme des Systems geben. Betrachtet man den oberen Teil der Abbildung 3.21, so ist zu erkennen, dass eine ausgeprägte logarithmische Phase bis zum Zeitpunkt von 20 Stunden vorlag. Mit Erreichen der 20 Stunden strebte der  $pO_2$  seinem ersten Minimum entgegen, und es lag bereits eine Biomassekonzentration von 16 g/l vor. Zu diesem Zeitpunkt war bei der Kohlendioxid-Bildungsrate eine Änderung des Anstiegs zu beobachten.

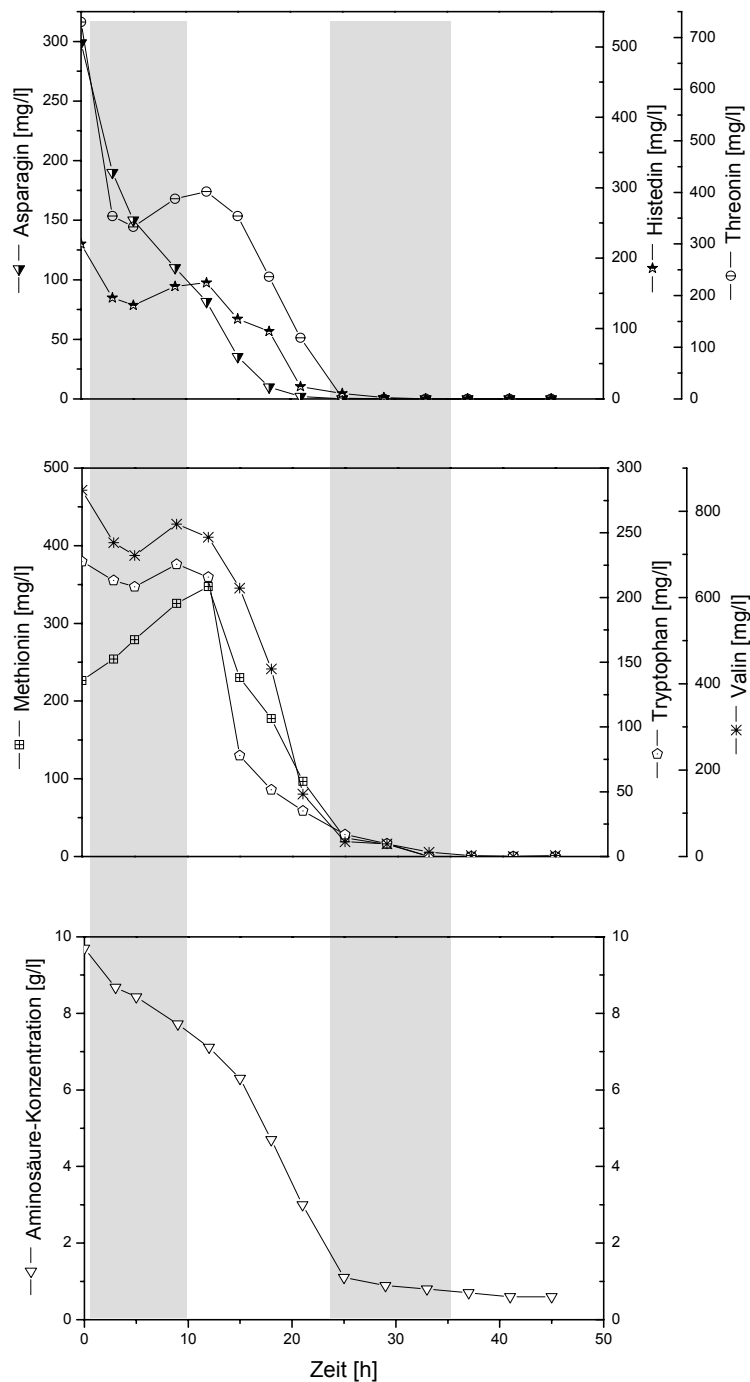
Es folgte ein kurzzeitiger Anstieg und Abfall des  $pO_2$  bis der Wert für sieben Stunden gehalten wurde und dann sprunghaft wieder anstieg. Gegenteilig dazu verhielt sich wie erwartet die Kohlendioxid-Bildungsrate, welche sich nach Erreichen eines Maximums stark verringerte.



**Abbildung 3.21:** Batch-Kultivierung von *Microbacterium spec.*: Darstellung des Biomasse- und Glycerin-Verlaufs sowie des Sauerstoffpartialdrucks, der Kohlendioxidbildungsrate, Sauerstoffaufnahme, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 7,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 mit einem Anteil von jeweils 20 g/l Bacto Pepton und Hefeextrakt), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattührer

Da nach 20 Stunden noch über die Hälfte des Glycerins vorhanden war, weiterhin weder der  $pO_2$  noch andere Größen limitierend auf das System wirkten, wurde der Abbau der Aminosäuren genauer betrachtet (Abbildung 3.22). In den Teilgraphen ist der Bereich von 0 bis 10 und 25 bis 35 Stunden grau hinterlegt, um die einzelnen Abschnitte besser unterscheiden zu können.





**Abbildung 3.22:** Batch-Kultivierung von *Microbacterium spec.*: Darstellung von einigen dedektierbaren Aminosäuren, sowie der Gesamt-Konzentration an Aminosäuren Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 mit einem Anteil von jeweils 20 g/l Bacto Pepton und Hefeextrakt), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

In den ersten 10 Stunden konnte man beobachten, dass die Aminosäuren Valin und Histidin konstante Konzentrationen aufwiesen, die Methionin-Konzentration dagegen anstieg. Das Asparagin wurde von Anfang an abgebaut.

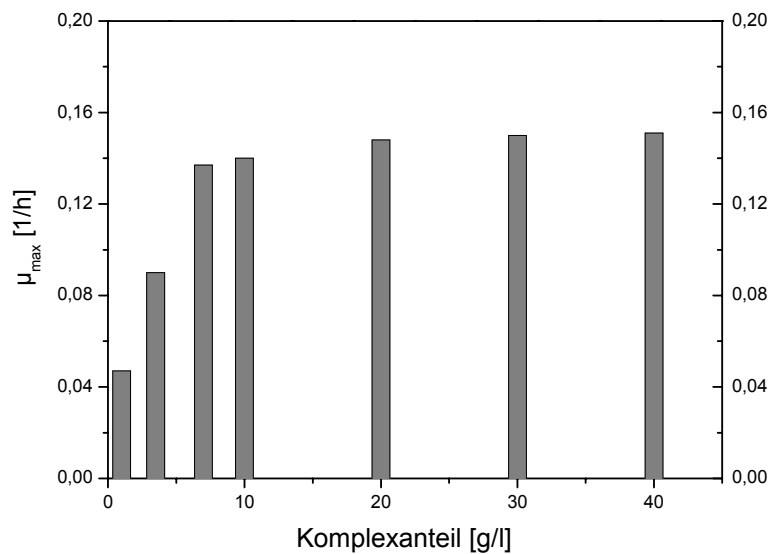
Im nächsten Abschnitt (10 bis 25 Stunden) folgte der Beginn des Abbaues der anderen Aminosäuren. Die Kohlendioxidbildungsrate strebte zum Ende dieser Phase ihrem Maximum entgegen. Genau zu diesem Zeitpunkt erreichte die Aminosäure Asparagin den Wert Null. Es folgen Histidin und Threonin. Nicht alle Aminosäuren wurden vollständig verbraucht, sondern erreichten teilweise nur ein Minimum.

Die ersten beiden Abschnitte (0 – 25 Stunden) werden durch den Abfall des  $pO_2$  begleitet (Abbildung 3.21). Nach den 25 Stunden lag noch eine Glycerinkonzentration von 8 g/l vor, die folgend nicht vollständig, sondern nur bis zu einer Konzentration von 4,5 g/l Glycerin abgebaut wurde.

Für die Darstellung des Substratabbaus an Aminosäuren wurde alle Werte der Aminosäuren summiert jedoch nur der Abbau und nicht die Bildung der Aminosäuren gewertet.

Nach dieser Darstellung einer einzelnen Kultivierung sollten als nächstes die Wachstumsraten im Verhältnis zu den Substratkonzentrationen betrachtet werden. Die Substratkonzentration wurde in diesem Fall durch die gesamte Menge an Komplexanteil (Hefeextrakt/Bacto Pepton 1/1) definiert. Es zeigte sich der typische Verlauf der Monod-Kinetik (Abbildung 3.23), d.h. die Kurve nahm einen sigmoiden oder hyperbolen Verlauf. Am Anfang, bei niedrigen Komplexkonzentrationen, war ein steiler Anstieg der spezifischen Wachstumsrate zu verzeichnen. Ab einer Konzentration von 7 g/l stagnierte diese jedoch und ging in einen konstanten Bereich über.

Auch in diesem Fall wurden die Daten noch einmal mit der Tabelle 3.8 zusammengefasst. Mit steigendem Komplexanteil zeigte sich deutlich eine Verkürzung der Kultivierungszeit. Damit verbunden konnte die Produktivität bei der Kultivierung mit den 40 g/l Komplex auf den Wert von  $20,4 \text{ mg/lh}^{-1}$  gesteigert werden.



**Abbildung 3.23:** Maximale spezifische Wachstumsraten  $\mu_{\max}$  des *Microbacterium spec.* bei Batch-Kultivierungen mit unterschiedlichem Gehalt an Komplexanteil (Hefe-extrakt/Bacto Pepton 1/1), Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l-min, pH-Wert 7,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 ohne Hefeextrakt und Bacto Pepton), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

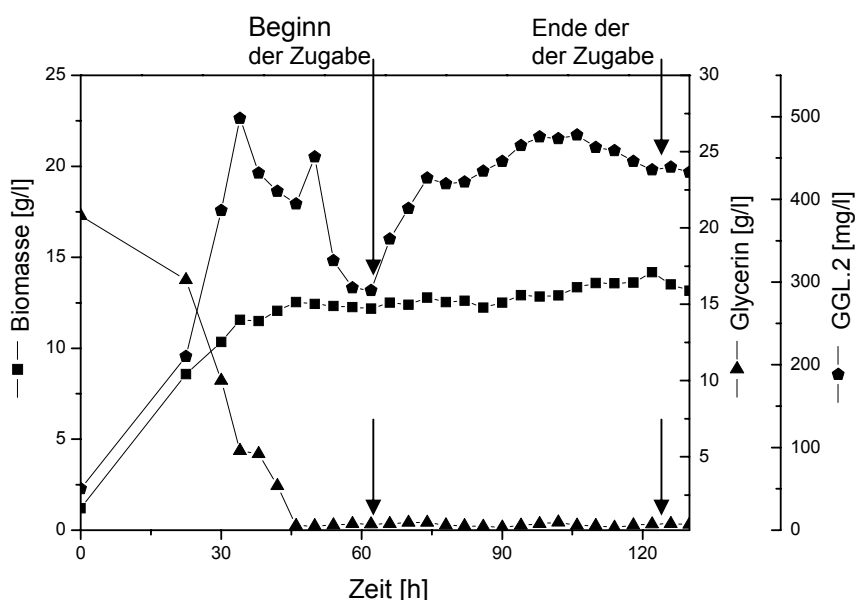
**Tabelle 3.8:** Gegenüberstellung der Kultivierungsergebnisse des *Microbacterium spec.* bei variierendem Komplexanteil-Gehalten, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l-min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 ohne Hefeextrakt und Bacto Pepton), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

Komplex-	Biomasse	GGL.2 <sub>max</sub>	P <sub>V</sub>	$\mu_{\max}$	Y <sub>P/X</sub>	Kultivie-
Konzentration	[g/l]	[mg/l]	[mg/lh]	[1/h]	[mg/g]	rungszeit
[g/l]						[h]
1,0	4,0	102	2,3	0,047	30,1	63,5**
3,5	5,5	172	8,6	0,090	32,0	54**
7,0	14,0	522	11,8	0,137	46,0	54
10,0	14,5	410	10,5	0,139	35,4	48
20,0	16,1	421	10,8	0,140	32,1	48
30,0	17,3	468	18,0	0,148	32,9	42
40,0	19,0	490	20,4	0,151	37,3	41**

\*\* Substrat wurde nicht vollständig aufgebraucht

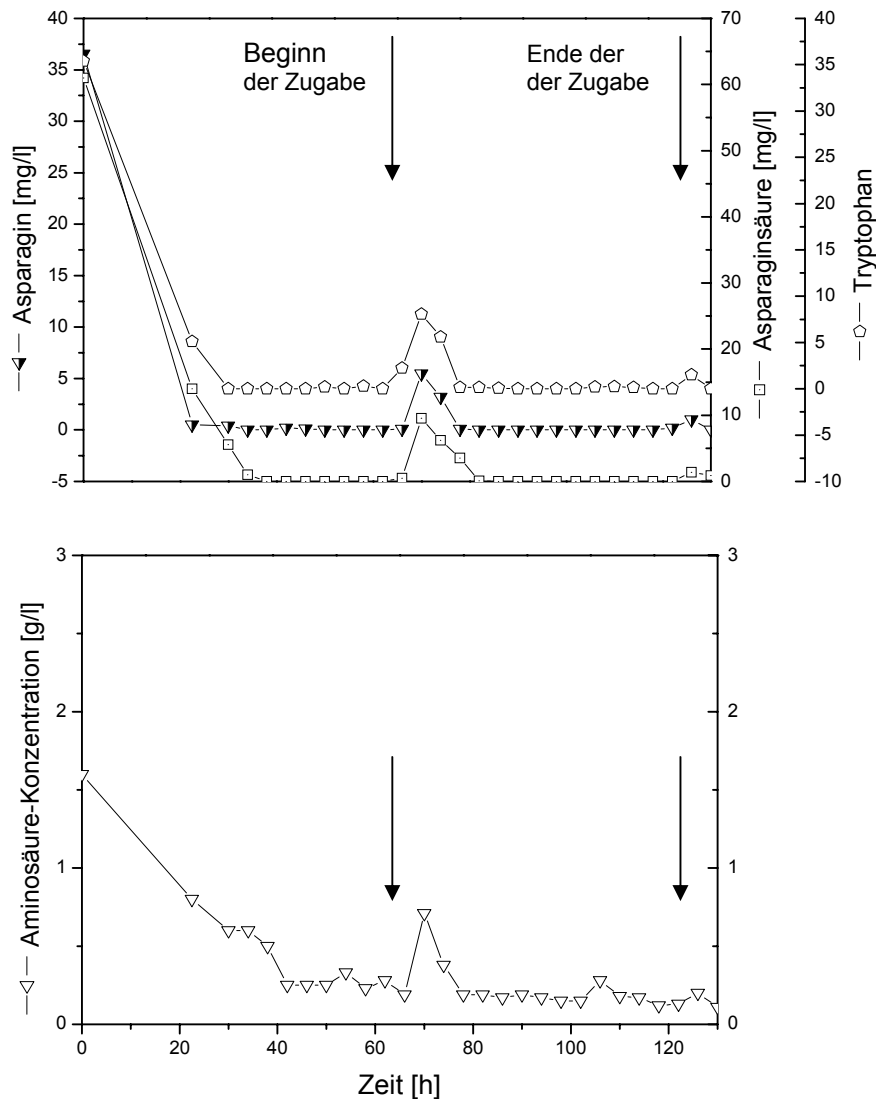
### 3.3.1.9 Kontinuierliches Zufüttern von konzentrierter Komplex-Lösung

Nachdem der limitierende Faktor für das Wachstum in Form der freien Aminosäuren des Komplexanteiles bekannt war, konnte dieser stark konzentriert in kleinen Raten zudosiert werden. Zunächst wurden in Schüttelkolben-Versuchen einzelne Aminosäuren einem Minimalmedium zugesetzt, was zu keiner Verbesserung des Wachstums oder zum längeren Erhalt der Biomasse führte. Um das ganze Spektrum der Komplex-Inhaltsstoffe beobachten zu können, wurde der Kultur konzentrierte Komplex-Lösung (Hefeextrakt/Bacto Pepton 1/1) in einer sehr kleinen Zuflussrate kontinuierlich zugesetzt (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24:** Fed-Batch-Fermentation des *Microbacterium* spec. unter kontinuierlicher Zudosierung von Komplexlösung (80 g/l Hefeextrakt/Bacto Pepton 1/1), Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l-min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

Nach 62 Stunden wurde begonnen, die konzentrierte Komplexlösung zu dosieren. Insgesamt wurde 400g Hefeextrakt und Bacto Pepton im Verhältnis von 1/1 in einem Volumen von fünf Litern gelöst. Mit einer anfänglichen Rate von 1,5 Litern in 24 Stunden wurde begonnen. Dies entspricht einer Flüssigkeitsmenge von 65 ml in der Stunde und einem Komplexanteilgehalt von 5 Gramm. Wie man an den Daten der Biomasse sehen konnte, wurde die Biomassekonzentration über einen Zeitraum von 24 Stunden gehalten. Anschließend wurde die Zuflussrate auf 97 ml/h erhöht, was einem Komplexanteil von 7,7 g/h entsprach.



**Abbildung 3.25:** Aminosäurenverwertung einer Fed-Batch-Fermentation des *Microbacterium spec.* unter kontinuierlicher Zudosierung von Komplexlösung (80 g/l Hefeextrakt/Bakto Pepton 1/1), Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blatttrührer

Mit der Einstellung der ersten Fließrate wurde ein kurzzeitiger Konzentrationspeak bei den Aminosäuren ausgelöst (Abbildung 3.25). Nach dieser kurzzeitigen Konzentrationserhöhung stellte sich jedoch wie zuvor ein konstantes Verhalten bezüglich der eingesetzten Mengen ein. Die gemessenen Werte waren bezüglich der zugesetzten Mengen an Komplex verhältnismäßig gering. Während der Batch-Kultivierung (Abbildung 3.21; 40 g/l Komplex) konnten die einzelnen Aminosäuren im g/l Maßstab nachgewiesen sowie der anschließende Abbau beobachtet werden.

Durch die kontinuierliche Zufütterung des Komplexanteils wurde ein Anstieg einzelner Aminosäuren erwartet, welche dann ebenfalls den g/l Bereich erreichen sollten. Dieses Verhalten zeigte sich zu keinem Zeitpunkt. Es konnten nur Werte im mg-Bereich aufgezeichnet werden.

### 3.4 Modellbildung

Biotechnologische Prozesse sind durch eine Vielzahl von Einflussgrößen und Variationsmöglichkeiten charakterisiert. Optimierungen auf rein empirischem Weg sind in der Regel aufwendig. Der Zweck und das Ziel der Modellbildung werden an dieser Stelle kurz erläutert:

- Abschätzung der Gesamtkosten von Produktionsanlagen
- Weniger Entwicklungsarbeit und damit schnelleres Anfahren von Produktionsanlagen
- Simulation der Verfahrensweise (z.B. Batch-Kultivierung) und dadurch Abschätzen von Produktionszeiten und –kosten
- Erleichterung des Scale-up durch die Kopplung von Biomodell und Reaktormodell
- Hilfsmittel zum gezielten und systematischen Arbeiten
- Kostenersparnis durch Vorausberechnungen
- Simulation kann zur besseren Orientierung beitragen

Für die sinnvolle Erstellung eines Modells müssen die Hauptvariablen des Prozesses bekannt sein. Für marine Organismen existieren bisher nur wenige Prozessdaten [Lang, Lurtz 2005]. Um maximale Wachstums- und Produktbildungsraten zu erzielen, müssen diese jedoch auch optimale Umgebungsbedingungen aufweisen. Dazu gehören neben der Temperatur, dem pH-Wert, den Medienbestandteilen auch die Strömungsbedingungen oder die Scherbeanspruchung. Entscheidend ist ebenfalls die Wahl des Reaktors aufgrund des Durchmischungsverhaltens und des Stoffüberganges.

In einem optimierten Medium wird eine direkte Proportionalität zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit  $dx/dt$  und der Biomassekonzentration  $x$  beobachtet. Die

Gleichungen für die Berechnungen der Biomassekonzentration im Batch-Betrieb (Gl. 2.1) und der spezifischen Wachstumsrate nach Monod (Gl. 2.2) wurden im Kapitel 2.4.3 beschrieben und soll an dieser Stelle nicht wiederholt werden.

### 3.4.1 Modellbildung für den Batch-Betrieb

Gültigkeitsbereich:	- Kultivierungstemperatur	$T = 30^{\circ}\text{C}$
	- Begasungsrate	$F = 0,4 \text{ l/l} \cdot \text{min}$
	- Drehzahl	$n = 500 \text{ min}^{-1}$
	- Rührertyp	Ruschturbine

Angewandte mathematische Modelle:

Die Biomassebildung kann in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mit der Monod-Kinetik beschrieben werden (Gl. 2.1 und Gl. 2.2).

Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max}$  konnte aus mehreren Batch-Kultivierungen abgeleitet werden (Kap. 3.3.1.8). Aus den Daten dieser Kultivierungen und der graphischen Darstellung nach Lineweaver-Burk wurde der  $K_S$ -Wert abgeleitet (Kap. 4.2).

Da das Produkt überwiegend mit den Zellen, d.h. wachstumsgekoppelt angereichert wird, kann auch die Modellbildung für das Produkt auf der Basis der Biomassebildung beschrieben werden.

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = A \cdot \frac{dx}{dt} \frac{1}{x} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Der Koeffizient A ist nur von der Anfangskonzentration des Produktes abhängig.

$$P = P_{(t=0)} \cdot e^{(\mu_{\max} \frac{S}{S+K_S}) t} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

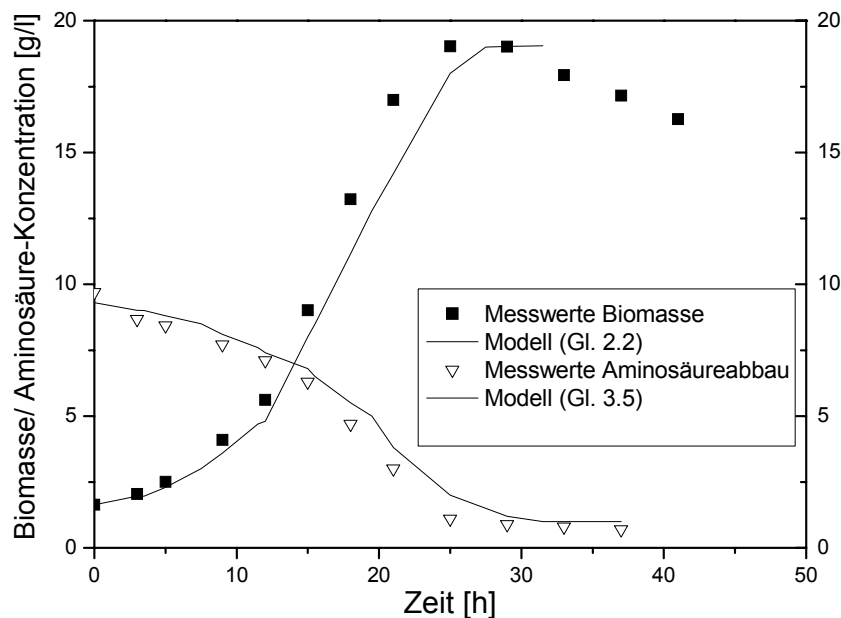
Die letzte Größe, welche in ihrem Verlauf über die Zeit durch ein mathematisches Modell beschrieben werden soll, ist der Substratverbrauch. In diesem Fall ist dies die Abnahme der Aminosäurekonzentrationen des Komplexanteils.

$$S = f(X, S_{(t=0)}, K_S) \quad (\text{Gl. 3.4})$$

$$-\frac{dS}{dt} = z \cdot \mu \quad (\text{Gl. 3.5})$$

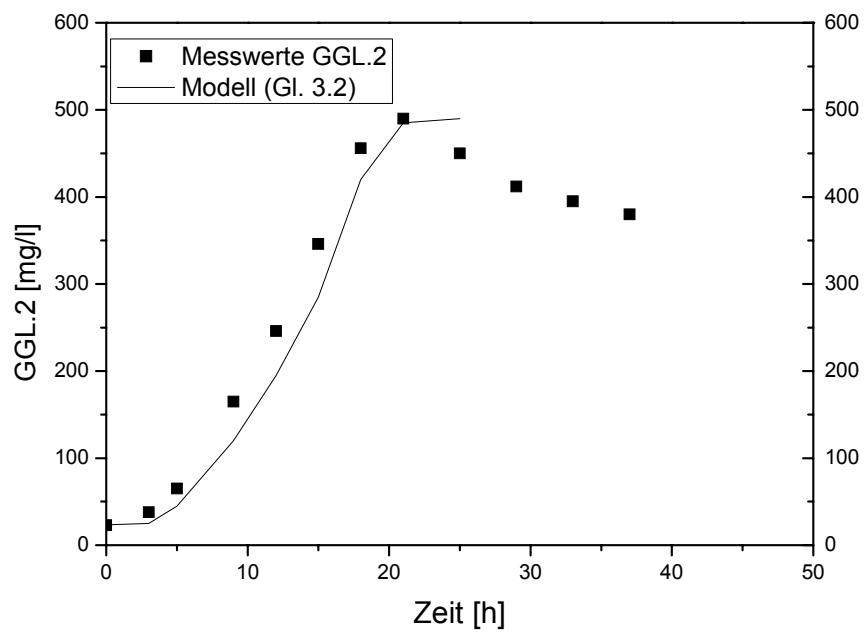
Um unbekannte Einflüsse, wie die Stoffwechselerhaltung, die Bildung von Nebenprodukten und die vorherrschenden Milieubedingungen zu berücksichtigen, wurde es notwendig, den Anpassungskoeffizienten  $z$  einzuführen.

In allen Fällen (Biomassebildung, Produktbildung, Substratverbrauch) wurde eine Übereinstimmung der modellierten Daten mit den experimentell ermittelten Daten gefunden (Abbildung 3.26, 3.27).



**Abbildung 3.26:** Simulation des Verlaufes (Biomasse und Aminosäurekonzentration) einer Batch-Kultivierung mit 40g/l Komplexanteil mit *Microbacterium spec.*, Kultivierungsbedingungen: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer





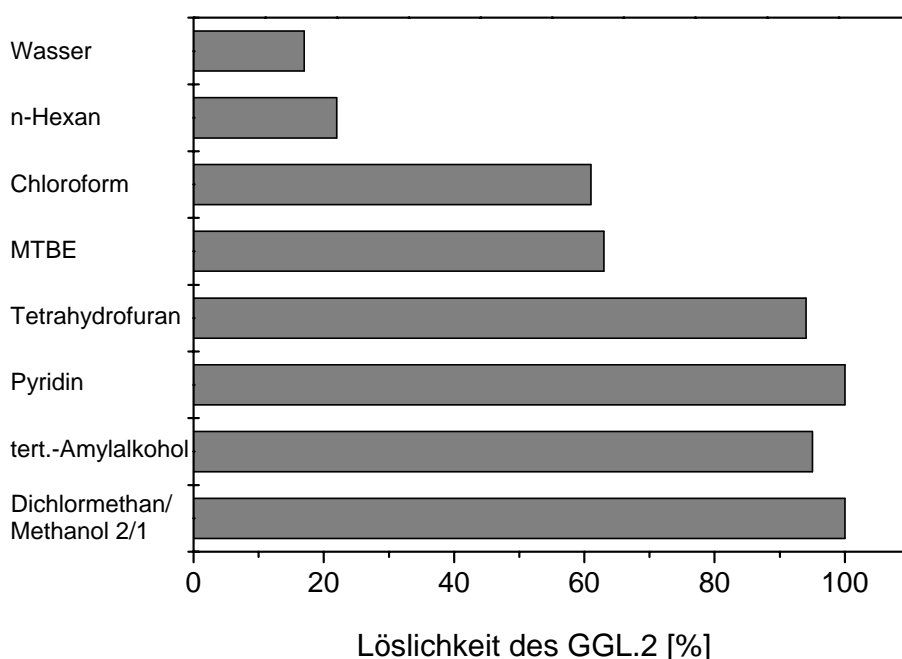
**Abbildung 3.27:** Simulation des Produktbildungs-Verlaufes einer Batch-Kultivierung mit 40g/l Komplexanteil mit *Microbacterium spec.*, Kultivierungsbedingungen: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle 20g/l Glycerin, Blattrührer

### 3.5 Enzymatische Modifikation des Glycoglycerolipids GGL.2

Für eine Verbesserung der Eigenschaften von Naturstoffen ist oft eine enzymatische oder chemische Modifikation der ursprünglichen Substanz nötig. Innerhalb dieser Arbeit sollte zunächst aus dem Glycoglycerolipid enzymatisch das Glycoglycerin hergestellt werden. Danach sollte das resultierende Kohlenhydratglycerinrückgrat mittels enzymatischer Acylierung mit anderen Fettsäuren funktionalisiert werden.

#### 3.5.1. Gewinnung des Glycoglycerin GG 2 durch enzymatische Hydrolyse

Grundlage für diese Versuche war die geeignete Lösemittelwahl für das Enzym sowie für das Glycoglycerolipid.



**Abbildung 3.28:** Löslichkeit des Substrats GGL.2 in verschiedenen Lösemitteln

Das Glycoglycerolipid GGL.2 zeigte eine sehr schlechte Löslichkeit in Wasser und n-Hexan (Abbildung 3.28). Gute bis sehr gute Löslichkeiten ergaben sich statt dessen bei tertiärem Amylalkohol, Pyridin, und THF. Die Probe mit dem Dichlormethan-Gemisch wurde zum Vergleich aufgetragen, da bekannt war, dass das Substrat in diesem Lösemittel zu 100% löslich ist.

Gerade bei der Hydrolyse ist Wasser für den Reaktionsablauf erforderlich. In der folgenden Tabelle 3.9 sind verschiedene Versuche aufgelistet, in denen die Reaktion des Enzyms mit dem Substrat in den Medien überprüft wurden.

**Tabelle 3.9:** Enzymatische Hydrolyse von GGL.2 in verschiedenen Lösemitteln.  
Bedingung: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL. 2 + 5 mg Novozym Lipase 435; 50° C;  
100 min<sup>-1</sup>; 48 h

Ansatz	Umsetzung
1,5 ml Phosphatpuffer (pH 7,0)	-
1,5 ml Phosphatpuffer (pH 5,0)	-
1,5 ml tert. Amylalkohol/dest. H <sub>2</sub> O 1/1	-
1,5 ml tert. Amylalkohol/dest. H <sub>2</sub> O 1/10	-
1,5 ml THF/dest. H <sub>2</sub> O 1/1	-
1,5 ml tert. Amylalkohol (H <sub>2</sub> O<1%)	++
1,5 ml THF (H <sub>2</sub> O<1%)	+
1,5 ml MTBE (H <sub>2</sub> O<1%)	-
1,5 ml n-Hexan (H <sub>2</sub> O<1%)	-
1,5 ml Pyridin	-
1,5 ml Pyridin/MTBE 1/1	+
1,5 ml Pyridin/tert.-Amylalkohol 1/1	+

++ vollständige, + teilweise, - keine Umsetzung

Nach der schlechten Löslichkeit des Substrats in wässrigem Milieu zeigte sich ebenfalls, dass Phosphatpuffer als Reaktionsmedium ungeeignet war. Gute Resultate bei der enzymatischen Hydrolyse wurden mit den Lösemitteln THF und einer Kombination aus Pyridin/MTB-Ether (1/1), sowie Pyridin/tertiärem Amylalkohol (1/1) erzielt. In den Einzelansätzen, in welchen MTB-Ether und Pyridin verwendet wurden, zeigten sich keine Reaktionen. Die beste Umsetzung erfolgte bei dem Ansatz mit tertiärem Amylalkohol und einem Wasseranteil kleiner einem Prozent. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden beobachtet und zeigte eine vollständige Umsetzung.

Neben der Novozym Lipase 435 wurden weitere Enzyme geprüft welche Umsatzreaktionen mit dem Metaboliten GGL.2 hervorrufen konnten (Tabelle 3.10).

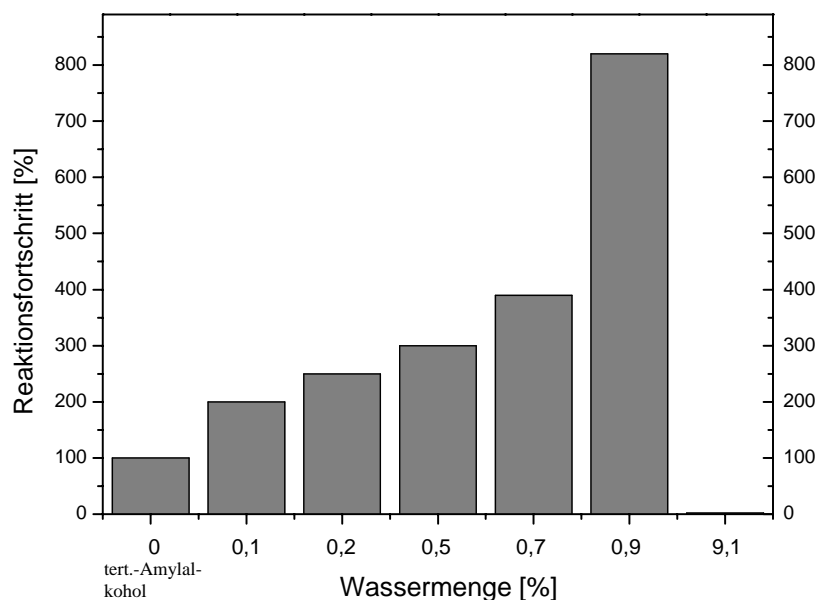
**Tabelle 3.10:** Umsatzreaktionen verschiedener Enzyme mit dem Metaboliten GGL.2 in den Lösemitteln tert.-Amylalkohol ( $\text{H}_2\text{O} < 1\%$ ) und Tetrahydrofuran (THF) ( $\text{H}_2\text{O} < 1\%$ ).  
Bedingung: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL. 2 + 5 mg Enzym;  $50^\circ \text{C}$ ;  $100 \text{ min}^{-1}$ ; 48 h

Enzym	Umsatz	
	tert.-Amylalkohol	Tetrahydrofuran
Novozym Lipase 435	++	+
Lipase <i>Candida cylindracea</i>	-	-
Lipase <i>Porcine pancreas</i>	-	-
Lipase <i>Rhizopus delamar</i>	-	-

++ sehr guter Umsatz, + guter Umsatz, - kein Umsatz

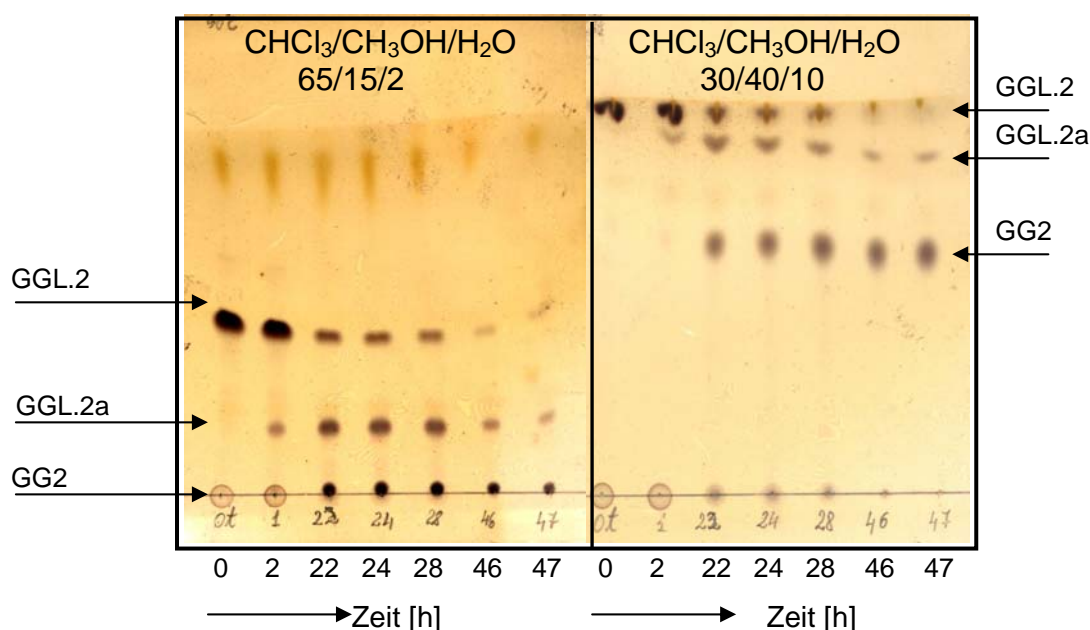
Ein gutes Medium für die Umsatzreaktionen war tertiärer Amylalkohol. Den besten Umsatz unter diesen Bedingungen zeigte das Enzym Novozym Lipase 435.

Der Tabelle 3.8 kann weiter entnommen werden, dass das anteilige Zusetzen von Wasser (1/10: 9 %, 1/1: 50 %) die Reaktion negativ beeinflusste. Da Wasser bei der Hydrolyse dennoch eine wichtige Rolle spielt, wurde in den nächsten Versuchen kontrolliert, ob Wassermengen kleiner 9 Prozent die Reaktion positiv beeinflussen (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29:** Reaktionsfortschrittes der enzymatischen Hydrolyse des GGL.2 mittels Novozym Lipase 435 durch das Zusetzen von Wasser, Reaktionsbedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL. 2 + 5 mg Enzym;  $60^\circ \text{C}$ ;  $100 \text{ min}^{-1}$ ; 48 h (tert.-Amylalkohol: Herstellerangaben:  $< 1\% \text{H}_2\text{O}$ )

Bei diesen Versuchen wurden nur die Reaktionsfortschritte nach 24 Stunden betrachtet. Nach dieser Zeit wurde die Menge an Hydrolysat der Ansätze untereinander verglichen. Als Vergleichsansatz diente der Ansatz mit 1,5 ml tert. Amylalkohol; dieses enthält laut Herstellerangaben weniger als ein Prozent Wasser. Additiv wurden 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 0,9 und 9,1 Volumenprozent Wasser zugesetzt. Danach wurde die Zunahme an Hydrolysat verglichen mit dem Standard gemessen. Aus den Versuchen war bekannt, dass bei einem Anteil von 9 Prozent keine Reaktion statt fand. Durch den minimalen Zusatz von Wasser konnte die Hydrolyse jedoch vorangetrieben werden (Abbildung 3.29). Bei diesem Versuch war das beste Resultat bei einem Anteil von 0,9 Vol.% Wasser. Die Menge an Hydrolysat konnte nach 24 Stunden um das Siebenfache gesteigert werden.



**Abbildung 3.30:** Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Hydrolyse des GGL.2 mittels Novozym Lipase 435, Reaktionsbedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL. 2 + 5 mg Enzym; 60°C; 100 min<sup>-1</sup>; 48 h, DC entwickelt in zwei unterschiedlichen Laufmittelsystemen: (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 65/15/2; CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 30/40/10)

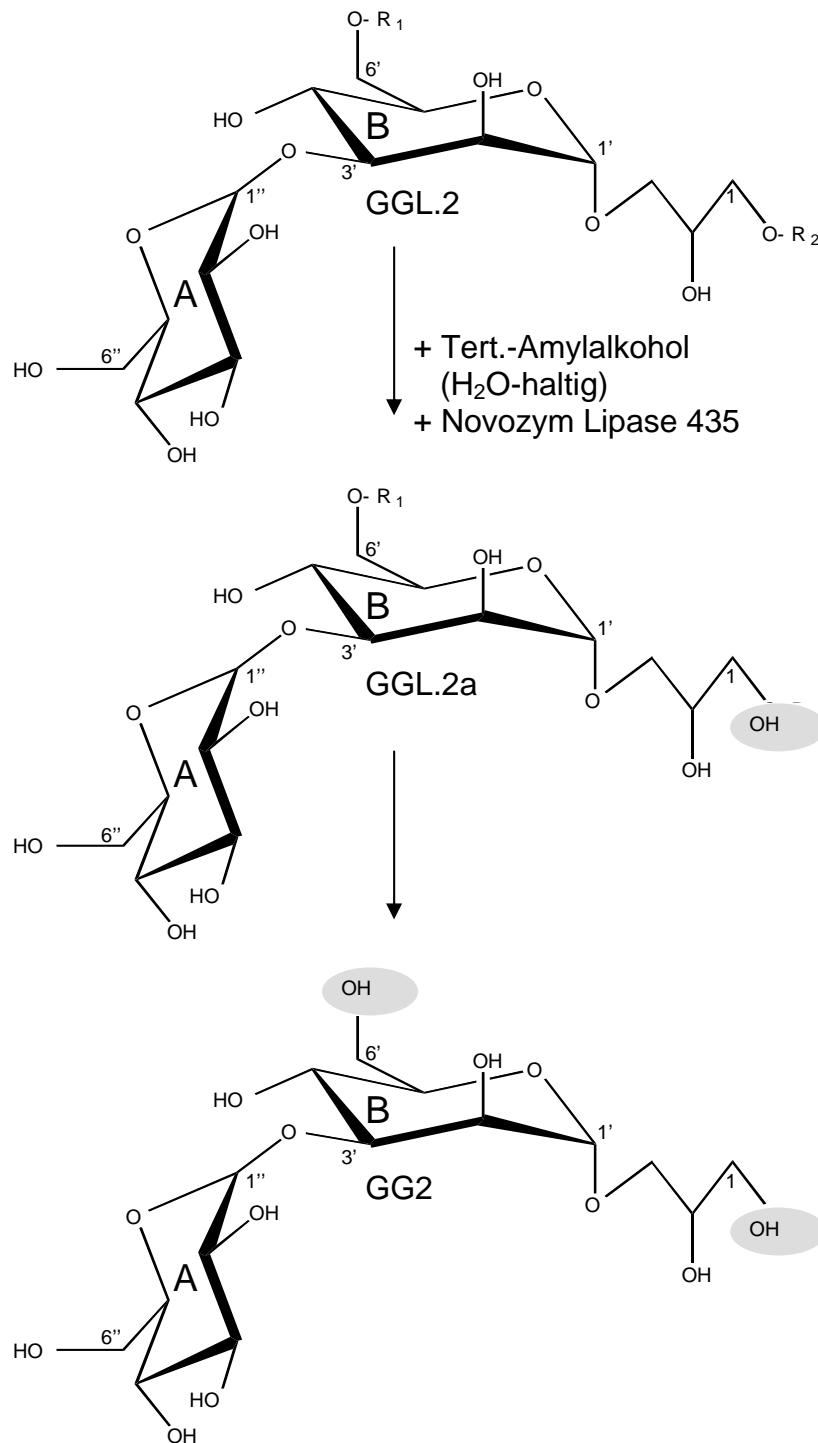
Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographien zeigten, dass die Umsetzung des Glycoglycerolipides GGL.2 in zwei Stufen ablief (Abbildung 3.30). Nach zwei Stunden war eine deutliche Abnahme der Ausgangssubstanz zu beobachten. Es bildete sich ein Zwischenprodukt (GGL.2a), welches sich auf der halben Höhe des nativen Metaboliten im gleichen Laufmittelsystem bewegte. Nachdem das GGL.2a nach

---

26 Stunden ein Maximum durchschritten hatte, wurde es ebenfalls kontinuierlich abgebaut. Um auch das Hydrolysat über den gesamten Zeitbereich verfolgen zu können, wurde jede Probe doppelt aufgetragen und zwei Laufmittelsysteme verwendet.

Nach 22 Stunden war eine Zunahme an Hydrolysat (GG2) zu beobachten. Diese nahm stetig zu, bis nach 48 Stunden das gesamte Substrat abgebaut und das Zwischenprodukt fast vollständig aufgebraucht war. Die Ausbeute bei dieser Reaktion betrug nach 48 Stunden 90 Prozent.

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen und der Charakterisierung der gewonnenen Produkte (Ergebnisse 3.5), konnte der chemische Reaktionsablauf konstruiert werden. Dieser gliederte sich wie schon erwähnt in zwei Schritte. Zuerst wurde die Fettsäure vom Glycerinrest abgespalten. Darauf folgend wurde die Ester-Bindung am Zucker aufgelöst. Die schematische Darstellung dieser Reaktion kann der Abbildung 3.31 entnommen werden.

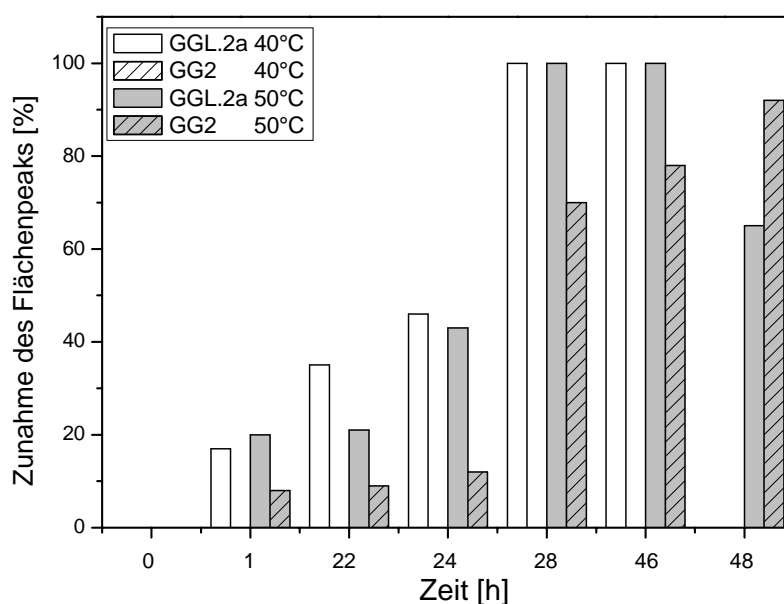


**Abbildung 3.31:** Chemischer Reaktionsanlauf der enzymatischen Hydrolyse des GGL.2 mittels Novozym Lipase 435 in tertiärem Amylalkohol (+ 0,9Vol.%  $H_2O$ -Zusatz), Reaktionsbedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL. 2 + 5 mg Enzym;  $60^{\circ}C$ ;  $100\ min^{-1}$ ; 48 h,

In weiteren Versuchen sollte das Temperaturoptimum ermittelt werden. Dazu wurde ein Temperaturintervall von 40° C bis 70° C untersucht. Es wurden sowohl das Zwischenprodukt (GGL.2a) als auch das Endprodukt (Hydrolysat) quantitativ vermessen

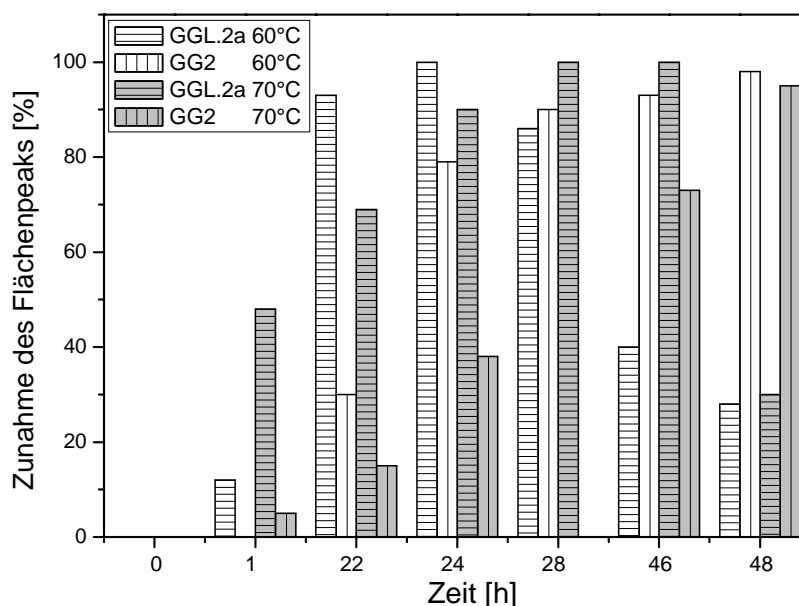
Nach der quantitativen Analyse des Intermediates zeigte sich, dass dieses bei unterschiedlichen Temperaturen in den Optima variiert (Abbildung 3.32 und 3.33). Bei einer Temperatur von 60 °C war das Maximum nach 24 Stunden erreicht. Dieses wurde nach weiteren 24 Stunden fast vollständig abgebaut. Bei den Temperaturen 40 °C und 50 °C ist der Maximalwert vier Stunden später erreicht worden. Bei einer Temperatur von 70 °C wurde das Maximum zwar ebenfalls nach 28 Stunden erreicht, der Abbau des Intermediates erfolgte jedoch langsamer.

Mit steigender Temperatur nahm die Bildung des Endproduktes GG2 zu und erreichte bei 60° C nach 48 Stunden fast 100% (Abbildung 3.33). Bei 40 °C konnte nur das Intermediat, nicht jedoch das Hydrolysat GG2 gebildet werden.



**Abbildung 3.32:** Bildung des Intermediates GGL.2a und des Kohlenstoffgerüsts GG2 während der Umsetzung des nativen Glycoglycerolipides GGL.2 in tertiärem Amylalkohol (H<sub>2</sub>O-haltig) und Novozym Lipase 435, Reaktionsbedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL. 2 + 5 mg Enzym; 40°C und 50°C; 100 min<sup>-1</sup>; 48 h,



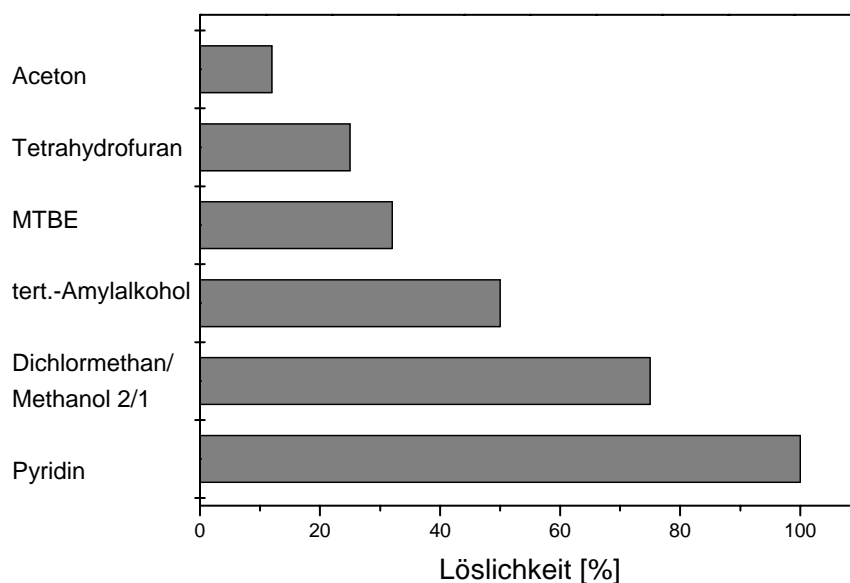


**Abbildung 3.33:** Bildung des Intermediates GGL.2a und des Kohlenstoffgerüsts GG2 während der Umsetzung des nativen Glycoglycerolipides GGL.2 in tertiärem Amylalkohol ( $\text{H}_2\text{O}$ -haltig) und Novozym Lipase 435, Reaktionsbedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL. 2 + 5 mg Enzym; 60°C und 70°C;  $100 \text{ min}^{-1}$ ; 48 h,

### 3.5.2. Versuche zur enzymatische Acylierung des GG.2

Nach der Isolierung und Anreicherung des Intermediates und des Hydrolysates sollte in den nächsten Versuchen verstärkt auf die Acylierung eingegangen werden. Dazu musste, wie zuvor, die Löslichkeit des Substrates in den verschiedenen Lösemitteln überprüft werden.

Da die Polarität des Substrates zugenommen hat, verschlechterte sich damit verbunden die Löslichkeit in unpolaren Lösemitteln (Abbildung 3.34). Flüssigkeiten wie n-Hexan wurden daher nicht getestet. Die Löslichkeit in wässrigen Systemen hatte sich dementsprechend gesteigert. Da bei der Acylierung Wasser jedoch störend wirkt, wurde darauf verzichtet, Wasser als Reaktionsmedium zu testen. Das beste Resultat konnte wie zuvor mit Pyridin erzielt werden. Anschließend wurde ein Eignungstest mit den Lösemitteln und verschiedenen Fettsäuren bzw. Fettsäureestern als Reaktionspartner durchgeführt.



**Abbildung 3.34:** Löslichkeit des Hydrolysates GG.2 in verschiedenen Lösemitteln

Das Resultat war ähnlich wie zuvor beim Glycoglycerolipid. In den reinen Lösemitteln Pyridin und TAA konnten keine Umsetzungen beobachtet werden (Tabelle 3.11).

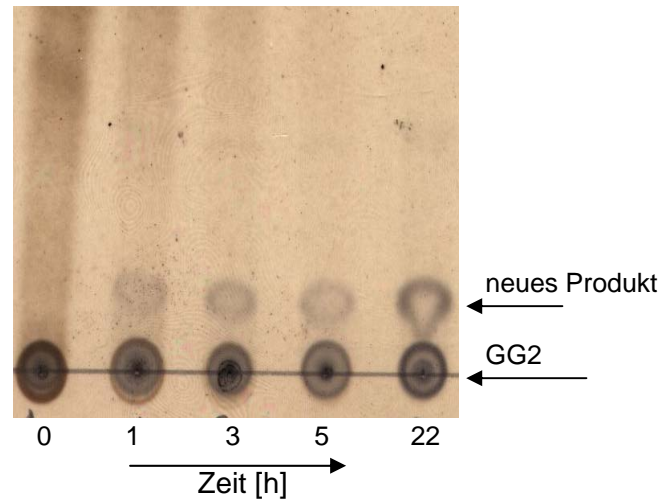
**Tabelle 3.11:** Enzymatische Acylierung von GG.2 in verschiedenen Lösemitteln. Bedingung: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL. 2 + 5 mg Novozym Lipase 435; 50 °C; 100 min<sup>-1</sup>; 48 h

Fettsäure bzw. -ester	Lösemittel					
	Pyridin	tert.-Amyl- alkohol	Pyridin/MTBE			
			1/1	2/1	5/1	9/1
Linolensäure	-	-	-	-	-	-
Methylinolenat	-	-	+	+/-	-	-
10 Undecensäure	-	-	-	-	-	-
Ethyl-dodecanat	-	-	+	+/-	-	-
4-Penten-säure	-	-	-	-	-	-
Vinyllaurat	-	-	+	+/-	-	-

++ vollständige, + teilweise, +/- schlechte, - keine Umsetzung

Die Mischungsansätze von Pyridin und MTB-Ether zeigten dagegen klare Anzeichen für eine Umsetzung und das beste Resultat wurde bei dem Verhältnis von 1/1 erzielt. Zur Bindung des entstehenden Reaktionswassers wurde mit einem aktivierten

Molsieb gearbeitet. Trotz des Einsatzes des Molsiebes konnte kein vollständiger Umsatz des Hydrolysates beobachtet werden.



**Abbildung 3.35:** Verlauf der enzymatischen Acylierung des GG.2 mit Methyllinolenat, Reaktionsbedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GG 2 + 5 mg Novozym Lipase 435; 50 °C; 100 min<sup>-1</sup>; 22 h

Mit der Abbildung 3.35 ist der Reaktionsverlauf bei der enzymatischen Acylierung mit dem Linolensäuremethylester dargestellt. Man erkennt, dass die mögliche Acylierung nach 22 Stunden ein Maximum erreicht hatte.

Auf Grund der geringen Ausbeute war eine Aufreinigung und Isolierung der Produkte nur begrenzt möglich.

### 3.6 Isolierung und Charakterisierung der Komponente GGL.2a sowie GG2

Nach der Anreicherung von Zellmaterial wurde dieses in vakuumfeste Vorratsgefäße gefüllt und über die Gefriertrocknungsanlage 4 Tage getrocknet (Material und Methoden 2.9.1). Das auf diese Weise behandelte Zellmaterial diente als Ausgangssubstanz für die Isolierung des Glycoglycerolipids.

Nach dem Aufschluss der Zellen (Material und Methoden 2.8.7) wurde der Zellextrakt in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (65/15/2) gelöst und über einen Membranfilter abfiltriert (Material und Methoden 2.9.2). Mittels einer MPLC-Anlage konnte der Zellextrakt in einzelne Fraktionen (der Polarität entsprechend) getrennt werden. Auf diese Weise ist nach dem Abotieren des Laufmittels das Glycoglycerolipid isoliert worden (Material und Methoden 2.9.2). Da sich die einzelnen Fraktionen teilweise überlappten, konnten aus einem Gramm Zellmasse bestenfalls 1/10 des theoretisch isolierbaren Produktes gewonnen werden. Zur Isolierung der Komponenten GGL.2a und GG2 wurde ähnlich verfahren (Material und Methoden 2.9.2). Durch die Wahl geeigneter Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse (Ergebnisse 3.4.1) wurden nacheinander GGL.2a (tert.-Amylalkohol ( $\text{H}_2\text{O} < 1\%$ ),  $40^\circ\text{C}$ , Novozym Lipase 435) und GG2 hergestellt. Das entstandene Reaktionsgemisch konnte dann durch die MPLC-Anlage getrennt und die Metaboliten isoliert werden.

Die Strukturaufklärung des Ausgangsmaterials GGL.2 sowie der enzymatisch erhaltenen Produkte GGL.2a und GG2 (Zellmasse aus Kultivierungen mit Glycerin als zusätzlicher C-Quelle) erfolgte durch eine Kombination der NMR- Spektroskopie und Massenspektrometrie. Eine Zuordnung der NMR Signale erfolgte über Kreuzpeaks der ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ )- und ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )- COSY-Spektren. Auf diese Weise wurde zuerst die diacylierte Form des GGL.2 bestätigt. Die Identifizierung der Zucker ergab sich über die jeweiligen H(1-2) Kopplungskonstanten, welche im Fall der Mannose mit 1,7 Hz deutlich geringer ausfiel als bei der Glucose mit 4,0 Hz.

Die Acylierungspositionen am C6 der Mannose (GGL.2a) sowie an C6 der Mannose und C3 des Glycerins (GGL.2) sind durch kleine chemische Verschiebungen (0,5/0,4 ppm) im Vergleich zum Totalhydrolyseprodukt GG2 sichtbar. Die prozentuale Zusammensetzung der Fettsäureanteile (anteiso- und iso Fettsäuren) ließ sich aus

---

den massenspektrometrischen Daten ablesen. Zum Vergleich wurden die Daten der Grundstruktur von Wicke mit angegeben (Anhang 7.3).

### **3.7 Untersuchung auf biologische Aktivitäten der Glycoglycerolipide**

Ziel dieser Arbeit war neben der Optimierung von Biomasse- und Produktbildung im Bioreaktor, größere Mengen des nativen Metaboliten GGL.2 sowie der Folgeprodukte GGL.2a und GG2 rein herzustellen, und damit weitere Tests hinsichtlich der biologischen Aktivität durchzuführen. GGL.2 wurde schon in früheren Bioaktivitätstests positiv beurteilt. So wurde zum Beispiel die Hemmwirkung auf verschiedene Proteinkinasen, welche an der Entstehung und Entwicklung von Tumorkrankheiten beteiligt sind, überprüft. Es zeigte sich eine Hemmwirkung gegen mehrere Proteinkinasen und damit ein breites Wirkungsspektrum, welches leider für die Entwicklung eines spezifisch wirkenden Kinasehemmstoffs ungeeignet war. Im Test auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA) zeigten sowohl das reine GGL.2 als auch seine durch chemische Verseifung hergestellte hydrolysierte Form GG2 eine deutliche Wirkung. Die damaligen Resultate zeigten, dass das Hydrolyseprodukt eine erheblich stärkere Inhibierung des TPA in geringsten Konzentrationen und eine stärkere Überlebensrate der beim Test eingesetzten Raji-Zellen bewirkte.

#### **3.7.1 Test zur Anti-Tumor- Promoting-Aktivität**

Alle drei rein isolierten Produkte (Strukturformeln: Anhang 7.3), GGL.2, GGL.2a und GG2, wurden dem Test bezüglich der Anti-Promoting-Aktivität unterzogen (Tabelle 3.12). Da innerhalb dieser Arbeit noch zwei weitere Stämme kultiviert wurden und einer von diesen ebenfalls das Glycoglycerolipid GGL.2 bildet, der andere dagegen einen zwar schon bekannten, jedoch noch nicht näher untersuchten Metaboliten (GGL.5), wurden diese ebenfalls im Test überprüft.

**Tabelle 3.12:** Beurteilung verschiedener Substanzen auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA)

Substanz	Konzentration [Molverhältnis/TPA]			
	% der positiven Kontrolle* (% Überlebensrate)			
	1000	500	100	10
GGL.2 <sup>w</sup>	17,5 (50)*	62,5	88,2	100
GGL.2	15,2 (70)	60,7	87,7	100
GGL.2a	6,2 (70)	35,6	74,5	93,3
GG.2 <sup>w</sup>	7,1 (60)*	42	71,6	93,8
GG.2	5,6 (70)	39,7	75,1	93,4
GGL.5	9,1 (70)	41,5	77,6	95,7

w - Ergebnisse von (Wicke 1999)

Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass das Intermediat (GGL.2a) und das neu getestete Glycoglycerolipid (GGL.5) ein sehr gutes Ergebnis hervorriefen. Bei beiden Substanzen wurde beobachtet, dass sie eine starke Inhibierung der Tumoraktivität bewirken und zusätzlich zu der starken Wirkung als Anti-Tumor-Promoting-Reagens eine hohe Überlebensrate und damit geringe Zytotoxizität gegenüber den Raji-Zellen auftrat.

### 3.7.2 Agardiffusionstest

Glycolipide treten als Bestandteile in Zellmembranen von Bakterien, Pilzen, Algen und höheren Organismen auf. Sie übernehmen wichtige Interaktionen, beispielsweise bei der Regulation des Zellwachstums, Adhäsion und Zelldifferenzierung.

Im Zusammenhang des vom Bundesministerium für Forschung unterstützten Nordsee-Projektes wurden auch Interaktionen zwischen den verschiedenen Meeresbakterien untersucht. Diese Überprüfung erfolgte ebenfalls über den Agardiffusionstests. Wie in früheren Experimenten wurden dazu die Zellextrakte, die Kulturüberstandsextrakte sowie die aufgereinigten Metaboliten eingesetzt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt und mit Penicillin G der gleichen Konzentration verglichen. Nachdem eine schwache Hemmung des GGL.2 festgestellt wurde, fand eine Erhöhung der Konzentration auf 2 mM statt. Die Konzentration des Penicillin G wurde beibehalten, da sonst eine zu starke Hemmung aufgetreten wäre. Die Ergebnisse des zweiten Versuches sind in der Tabelle 3.13 zusammengefasst. Die stärkste Hemmung des GGL.2 trat gegenüber dem Stamm mit der Abkürzung T4 auf. In diesem Fall war der Hemmhofdurchmesser sogar größer als der vom Penicillin G, wobei die unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Substanzen zu berücksichtigen waren. Gegenteilig zu den früheren Agardiffusionstests traten bei diesen Versuchen kaum Hemmungen bei den Zell- und Überstandsextrakten auf, sondern verstärkt bei der aufgereinigten Substanz GGL.2. Die Extrakte von *Micrococcus luteus* Hel 12/2 und das daraus isolierte GGL.5 zeigten bei diesem Test keinerlei positive Resultate.



**Tabelle 3.13:** Hemmwirkung von GGL.2, des Zellextraktes und des Überstandextraktes des *Microbacterium spec.* auf verschiedenen marinen Bakterien

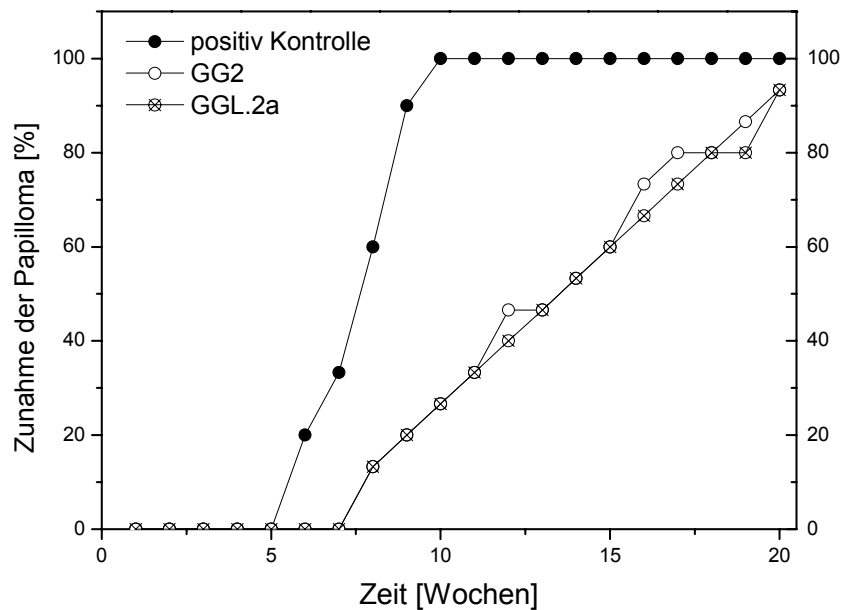
Testorganismus Abkürzung/Gattung/Klasse	Hemmhofdurchmesser [mm]			
	GGL.2	Überstandsextrakt	Zellextrakt	Penicillin G
<i>Aeromicrobium spec.</i> T2	3	-	1	15
$\alpha$ - <i>Erythromicrobium</i> T3	-	-	-	-
<i>Pseudonocardia spec.</i> T4	10	-	-	2
$\alpha$ - <i>Roseobacter</i> T5	-	-	-	7
$\gamma$ - <i>Pseudoalteromonas</i> T8	-	-	-	-
$\gamma$ - <i>Vibrio</i> T16	-	-	-	3
$\gamma$ - <i>Marinomonas</i> T17	-	-	-	4
<i>Arenibacter</i> HP2*	2	1	1	8
<i>Arthrobacter spec.</i> HP7	1	-	-	8
<i>Zobellia</i> HP25*	-	-	-	-

\* Flavobacteria-Sphingobacteria

- Die Angaben der Hemmhofdurchmesser beziehen sich auf den Abstand zwischen dem Testplättchen und dem Bakterienrasen.

### 3.7.3 In vivo Test (Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis Test)

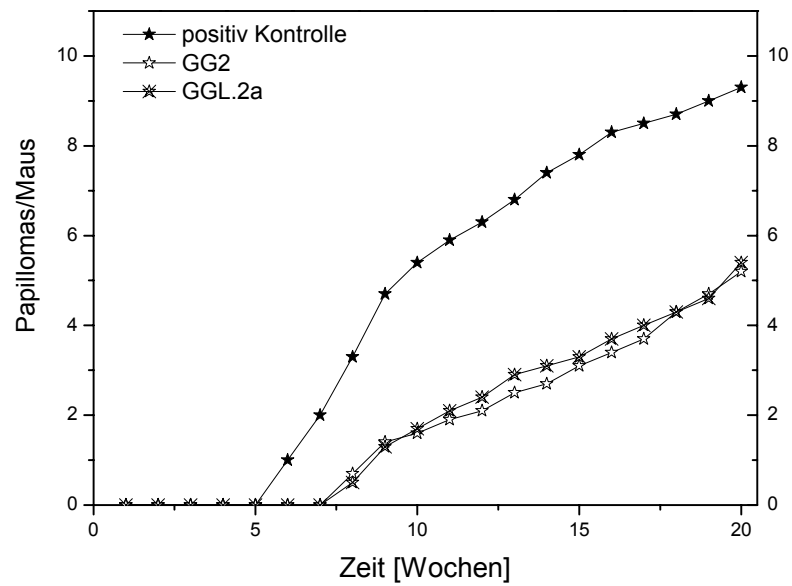
Alle bisherigen Tests wurden in vitro durchgeführt. Da die Komponenten GG.2 und GGL.2a jedoch sehr gute Eigenschaften hatte, wurde mit diesen Komponenten auch ein in vivo Test betrieben. Dazu wurden weibliche Mäuse mit den Substanzen behandelt und anschließend über 20 Wochen beobachtet (Material und Methoden). Zur Beurteilung der Wirksamkeit wurde die Zunahme der Geschwüre in Prozent sowie die Zunahme der Geschwüre pro Maus betrachtet (Abbildung 3.36, Anhang: Tabelle 7.7 und 7.8).



**Abbildung 3.36:** Einfluss von GG2 und GGL.2a auf die Entwicklung von Papilloma auf Hautgewebe von lebenden Mäusen, Positiv-Kontrolle: Behandlung der Haut nur mit Aceton (Material und Methoden 2.11.2)

Es wurde beobachtet, dass durch den Einsatz der Komponente GG2 prozentual weniger Geschwüre entstanden gegenüber der positiv Kontrolle (Abbildung 3.36). Ähnlich des Resultates der Komponente GG2 konnte durch den Einsatz des Intermediates GGL.2a die prozentuale Anzahl der Geschwüre gesenkt werden (Abbildung 3.37). Die Wirksamkeit der Substanzen unterschied sich nur minimal.

Die Daten, welche die Anzahl der Papilloma pro Maus angeben, unterstreichen dieses Resultat. Bei den Mäusen, welche nicht mit dem Metaboliten behandelt wurden, kam es nach 20 Wochen zur Ausbildung von 9,3 Papilloma pro Tier. Demgegenüber bildeten sich bei dem Einsatz des Wirkstoff GG2 nur 5,2 Papilloma und beim GGL.2a 5,4 Papilloma pro Maus aus (Abbildung 3.38).



**Abbildung 3.37:** Einfluss von GG2 und GGL.2a auf die Entwicklung von Papilloma auf Hautgewebe von lebenden Mäusen, Positiv-Kontrolle: Behandlung der Haut nur mit Aceton (Material und Methoden 2.11.2)



**Abbildung 3.38:** Fotos der behandelten und unbehandelten Mäuse nach dem In vivo Test (Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis Test) , rechts: behandelt, links: unbehandelt

### 3.8 Hel 12/1 und Hel 12/2

Im Rahmen des Niedersächsischen Forschungsschwerpunktes „Meeresbiotechnologie“ weckte der Stamm Hel 12 größeres Interesse. Er wurde in der Nähe von Helgoland aus dem Seewasser isoliert und bezüglich seines Wachstums und seiner Naturstoffbildung untersucht. Bei näherer Betrachtung zeigte es sich, dass es sich um eine Mischkultur von zwei Bakterien handelte, die getrennt werden konnten.

In beiden Fällen bildeten sich bei der Verwendung von festen Nährböden beige-farbene Kolonien. Nach der ersten Kurzbezeichnung Hel12/1 und Hel12/2 erfolgte nach der 16S-rRNA-Sequenzierung eine erste Zuordnung der Stämme.

Das Isolat Hel 12/1 konnte zu 99,7 Prozent der Gattung *Microbacterium* spec. zugeordnet werden (Sequenz: Anhang 7.1). Ähnlich wie bei dem aus dem Mittelmeer isolierten *Microbacterium* spec. DSM 12583 liegt auch bei diesem Stamm ein pleomorphes Wachstum vor. In Flüssigkultur sind zuerst runde kokkoide Formen zu erkennen, die dann zu kleinen Stäbchen während des Wachstums wechseln und beim Absterben wieder in Ihre erste, kokkoide Form zurückkehren. Nach erstem Überprüfen des Metabolitenspektrums der Zell- und Überstandsextrakte mittels Dünnschichtchromatographie wurde bei gleichem R<sub>f</sub>-Wert wie dem GGL.2 ein Glycolipid gefunden. Nach der Isolierung und Strukturaufklärung wurde die Vermutung, dass es sich um den Metabolit GGL.2 handelt, bestätigt.

Das Isolat Hel 12/2 wurde mit 99% Ähnlichkeit der Art *Micrococcus luteus* zugeordnet (Sequenz: Anhang 7.2). Bei der Flüssig-Kulturführung liegt über den gesamten Kultivierungsverlauf eine kokkoide Form der Zellen vor. Die Überprüfung der Zell- und Überstandsextrakte ließ im ersten Moment ein neu gebildetes Glycolipid (GGL5) vermuten.

Da es sich bei diesen Stämmen um neue Isolate aus der Nordsee handelte, wurde für weitere Versuche nach dem Schema der Abbildung 3.2 vorgegangen.

### 3.8.1 *Microbacterium spec.* (Hel 12/1) Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung

Auf Grund der Zuordnung von Hel 12/1 zur gleichen Gattung *Microbacterium* wurde bei der Medienoptimierung im Schüttelkolben auf dieselbe Art verfahren wie bei *Microbacterium spec.* DSM12583.

Begonnen wurde mit Hilfe der sehr einfach zu gebrauchenden BBL®-Testsysteme die Stoffwechseleigenschaften zu untersuchen [Hüners 1999]. Es folgten die Flüssigkultivierungen auf dem Komplexmedium Marine Broth mit und ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle (Glucose), sowie die Überprüfung des Wachstums und der Metabolitenbildung auf definierten Medien.

Nach dem Wechsel auf ein definiertes Medium wurden einzelne Medienbestandteile, z.B. die zusätzliche Kohlenstoffquelle, die Stickstoff- und Phosphatquelle sowie die Komplexanteile, der Mineralsalzgehalt und die Kultivierungstemperatur überprüft. Die Ergebnisse dazu befinden sich im Anhang (Tabelle 7.9 bis 7.19).

Da die Ergebnisse beider Bakterienisolate (*Microbacterium spec.* DSM 12583, *Microbacterium spec.* Hel 12/1) sehr ähnlich waren, werden sie an dieser Stelle tabellarisch gegenübergestellt und die Unterschiede markiert.

**Tabelle 3.14:** Gegenüberstellung der optimalen Wachstumsbedingungen für die beiden Bakterienisolate *Microbacterium spec.* Hel 12/1 (Nordseeisolat) und *Microbacterium spec.* DSM 12583 (Mittelmeerisolat) im Schüttelkolben auf SM1-Medium (Material und Methoden 2.3.2)

Parameter	<i>Microbacterium spec.</i> Hel 12/1	<i>Microbacterium spec.</i> DSM 12583
Mineralsalzgehalt des Seewassers	Natürlicher Mineralsalzgehalt des Seewasser	Natürlicher Mineralsalzgehalt des Seewasser
Kultivierungstemperatur	27 °C	27 °C
Glucosekonzentration	20 g/l	20 g/l
Stickstoffquelle	NaNO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl
Phosphatquelle Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,89 g/l	Ohne
Komplexanteil	Hefeextrakt/Bacto Pepton (3,5/3,5 g/l)	Hefeextrakt/Bacto Pepton (3,5/3,5 g/l)
Maximale Ausbeute (SM1-Medium + 20 g/l Glucose)	12 mg/g	15 mg/g

### 3.8.2 *Microbacterium spec.* (Hel 12/1): Bioreaktorkultivierungen zur Anreicherung der Zellmasse

Mit den Erkenntnissen aus den Schüttelkolbenkultivierungen wurden die ersten Bioreaktorkultivierungen zur Anreicherung der Zellmasse durchgeführt.

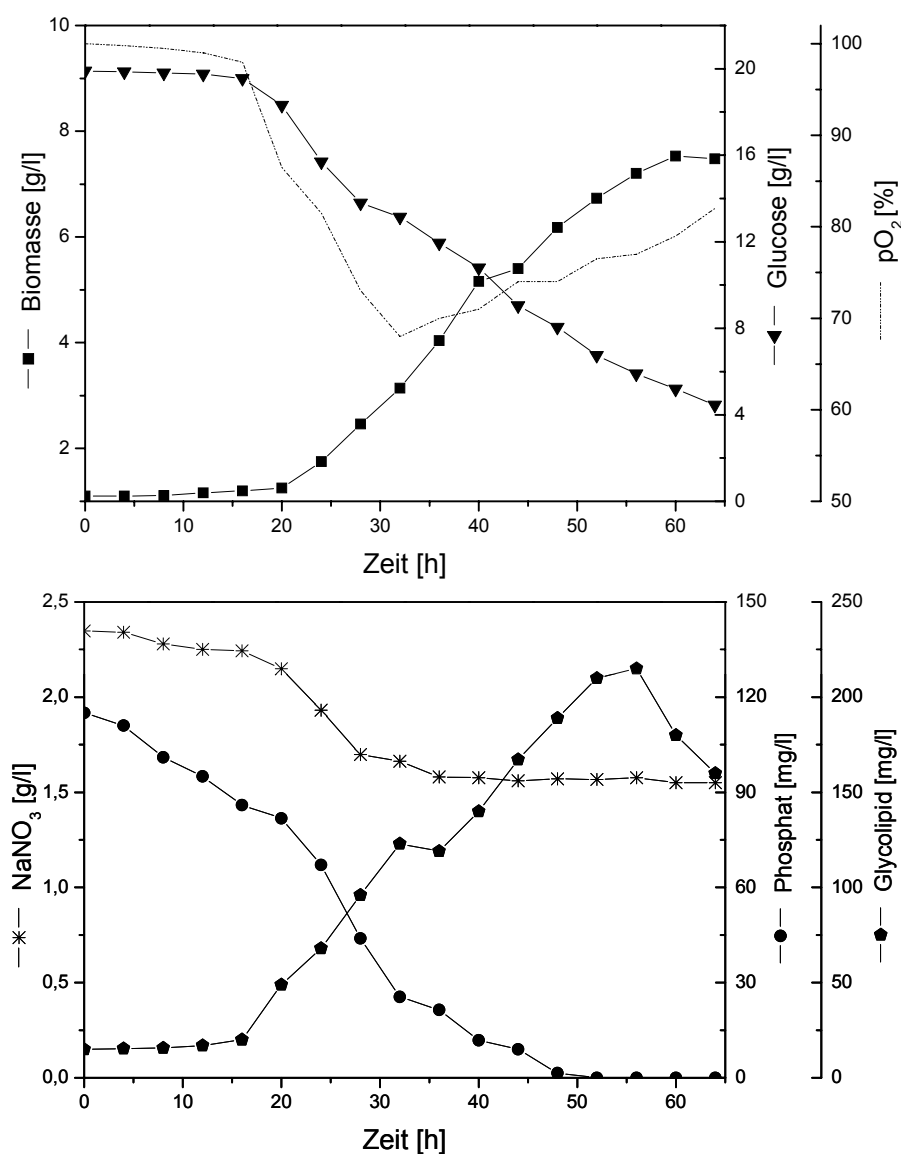
Ähnlich wie im Schüttelkolben wurde der pH in der ersten Kultivierung des *Microbacterium spec.* nicht geregelt. Es wurde mit einer relativ niedrigen Drehzahl von  $300 \text{ min}^{-1}$  begonnen und einer Belüftungsrate von  $0,6 \text{ l/l} \cdot \text{min}$ . Die gesamten Kultivierungsparameter wurden in der Tabelle 3.15 zusammengefasst.

**Tabelle 3.15:** Kultivierungsparameter für das *Microbacterium spec.* im 10-l Bioreaktor auf einem SM1-Medium (Material und Methoden 3.2)

Parameter	Einstellungen
Arbeitsvolumen	8 l
Temperatur	27 °C
pH-Wert	ungeregelt
Drehzahl	$300 \text{ min}^{-1}$
Belüftungsrate	$0,6 \text{ l/l} \cdot \text{min}$
C-Quelle	20 g/l Glucose
N-Quelle	2,5 g/l $\text{NaNO}_3$
P-Quelle	0,89 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Hefeextrakt	3,5 g/l
Bacto Pepton	3,5 g/l

In den ersten 24 Stunden (s. Abbildung 3.39) ist eine sehr lange lag-Phase zuerkennen. In diesem Zeitraum wurde stetig Phosphat abgebaut. Mit dem Beginn der exponentiellen Phase sank der  $p\text{O}_2$  ab und die Biomasse stieg an. Zum gleichen Zeitpunkt (20 h) begann der Abbau von Glucose und Nitrat. Nach 31 Stunden hatte der Sauerstoffpartialdruck einen Minimalwert von 68 % erreicht. Zu diesem Zeitpunkt lag eine Zellmasse von 3,8 g/l vor. Glucose war mit 12 g/l im Kulturmedium nachweisbar, die Phosphat-Konzentration betrug 30 mg/l und der Nitratabbau stagnierte. Insgesamt wurde bis zu diesem Zeitpunkt 1 g/l  $\text{NaNO}_3$  verbraucht. Der Verlauf der Produktbildung zeigte ebenfalls nach der exponentiellen-Phase eine kurze Stagnation.

Die Biomasse stieg in der Übergangsphase weiter an und erreichte einen maximalen Wert von 7,53 g/l. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine Glucose-Konzentration von 5 g/l nachgewiesen werden, welche sich in der stationären Phase auf 4 g/l weiter erniedrigte. Das im Kulturmedium enthaltene Phosphat konnte nach einer Kultivierungszeit von 48 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden und wurde somit vollständig aufgebraucht. Die Produktbildung war nach 56 Stunden maximal und betrug 215 mg/l.



**Abbildung 3.39:** Batch-Kultivierung von *Microbacterium spec.*(Hel12/1): Darstellung vom Biomasse-Glucose-, Phosphat-, Natriumnitrat- und Produktbildungs-Verlauf sowie dem Sauerstoffpartialdruck. Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 27°C, 300 min<sup>-1</sup>, 0,6 l/l·min, pH-Wert ungeregelt, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3): 2,5 g/l NaNO<sub>3</sub>, C-Quelle 20g/l Glucose, Blattrührer

In der Tabelle 3.16 sind die wichtigsten Resultate der Bioreaktorkultivierung zusammengefasst.

**Tabelle 3.16:** Kultivierungsergebnisse des *Microbacterium spec.* auf einem SM1-Medium (Material und Methoden 3.2) mit ungeregeltem pH, Arbeitsvolumen 8 l

Prozessgröße	Ergebnis
Reaktorlaufzeit	65,00 h
BTM <sub>max</sub>	7,53 g/l
GGL.2 <sub>max</sub>	215 mg/l
P <sub>V</sub>	3,84 mg/(l·h)
μ <sub>max</sub>	0,085 1/h
Y <sub>P/X</sub>	28,60 mg/g
Y <sub>P/S</sub>	15,3 mg/g

### 3.8.3 *Micrococcus luteus* (Hel 12/2) Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung

Mit dem *Micrococcus luteus* wurden im Schüttelkolben die gleichen Versuche zur Medienoptimierung wie mit dem *Microbacterium spec.* Hel 12/1 durchgeführt.

Die besten Kultivierungsbedingungen wurden bei dem natürlich vorkommenden Mineralsalzgehalt und künstlichem Seewasser (KSW-Medium: Material und Methoden 2.3.3) gefunden. Zusätzlich zur additiven Kohlenstoffquelle Glucose (20 g/l) benötigt das Bakterium für ein gutes Wachstum Natriumnitrat als zusätzliche Stickstoffquelle. Natriumhydrogenphosphat hatte keinen nennenswerten Einfluss auf Biomasse- und Produktbildung. Alle Ergebnisse zu den Einzelversuchen befinden sich im Anhang 7.6 dieser Arbeit von Tabelle 7.20 bis 7.30.

### 3.8.4 *Micrococcus luteus* (Hel 12/2) Bioreaktorkultivierungen zur Anreicherung der Zellmasse

Mit den Erkenntnissen aus den Schüttelkolbenkultivierungen wurden Bioreaktorkultivierungen zur Anreicherung der Zellmasse durchgeführt, um das neue Produkt aus der Zellmasse zu isolieren.

Die Kultivierungsparameter wurden in der Tabelle 3.17 zusammengefasst.



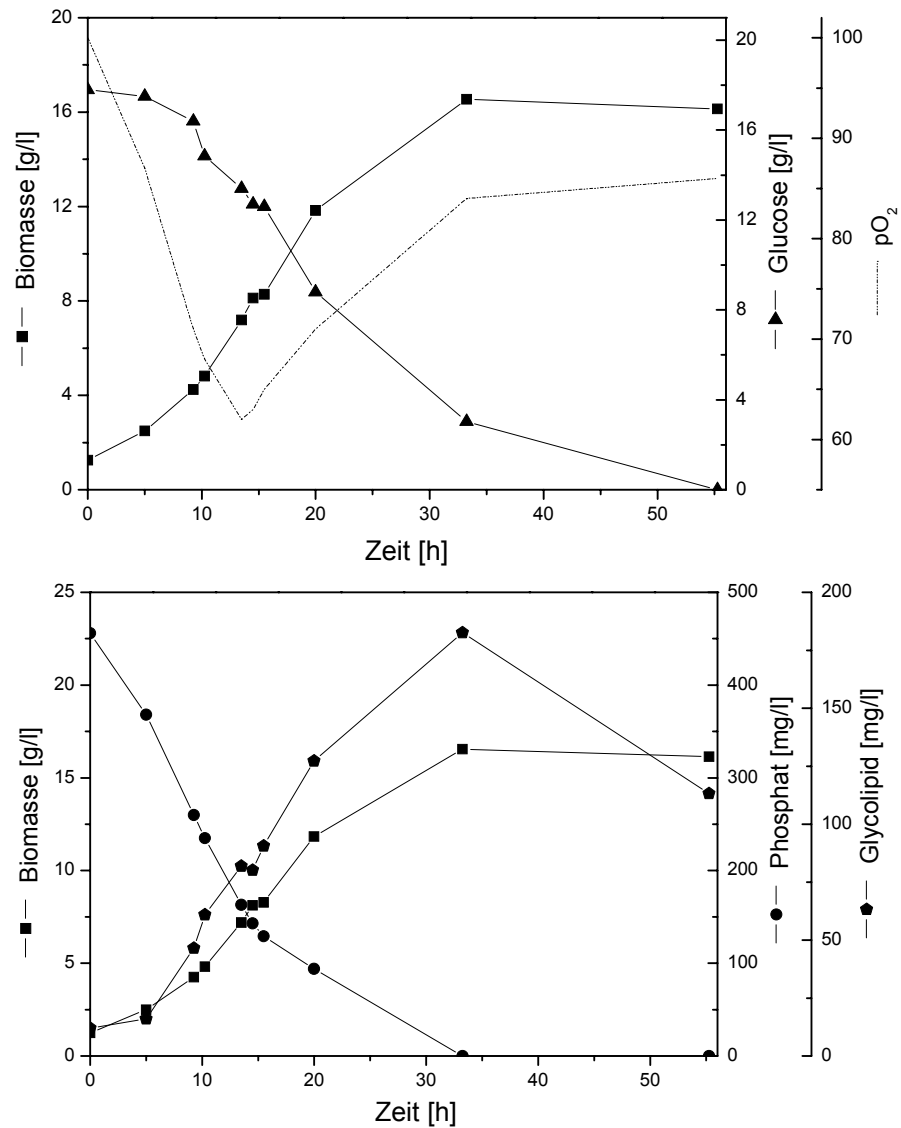
**Tabelle 3.17:** Kultivierungsparameter für *Micrococcus luteus* (Hel 12/2) im 10-l Bioreaktor auf einem KSW-Medium (Material und Methoden 3.2)

Parameter	Einstellungen
Arbeitsvolumen	8 l
Temperatur	30 °C
pH-Wert	ungeregelt
Drehzahl	500 min <sup>-1</sup>
Belüftungsrate	0,4 l/l·min
C-Quelle	20 g/l Glucose
N-Quelle	5 g/l NaNO <sub>3</sub>
P-Quelle	0,89 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Hefeextrakt	3,5 g/l
Bacto Pepton	3,5 g/l

Trotz der Ergebnisse aus den Schüttelkolbenkultivierungen, in denen zusätzliches Phosphat keinen nennenswerten Einfluss hatte, wurde der Kultur Natriumhydrogenphosphat zugesetzt, da sich dies bei anderen marinen Bakterien als positiv erwies [Wicke 1999].

In der Abbildung 3.40 ist deutlich zu erkennen, dass die lag-Phase sehr kurz war. Mit dem Absinken des pO<sub>2</sub> ging die Kultur in die exponentielle Phase über. Diese war nach 14 Stunden beendet. Zu diesem Zeitpunkt erreichte der pO<sub>2</sub> ein Minimum mit 62 %. Es lag eine Biomasse von 7,5 g/l vor und eine Glucose-Konzentration von 13,5. In der Übergangs-Phase nahm die Biomassebildung weiter zu und erreichte nach 32 Stunden einen maximalen Wert von 16,5 g/l. Zu diesem Zeitpunkt lag noch eine Rest-Glucose-Konzentration von 3,8 g/l vor während das Phosphat vollständig aufgebraucht war. Ähnlich wie bei den anderen Bakterienstämmen in dieser Arbeit wird das Glycolipid stetig gebildet und mit dem Erreichen der stationären-Phase sehr schnell abgebaut.

In Tabelle 3.18 sind die Ergebnisse von der Bioreaktorkultivierung des *Micrococcus luteus* zusammengefasst.



**Abbildung 3.40:** Ausgangs-Batch-Kultivierung von *Micrococcus luteus* (Hel 12/2): Darstellung vom Biomasse- Glucose-, Phosphat- und Produktbildungs-Verlauf sowie dem Sauerstoffpartialdruck. Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert ungeregelt, KSW-Medium (Material und Methoden 2.3): 5 g/l NaNO<sub>3</sub>, C-Quelle: 20g/l Glucose, Blattrührer

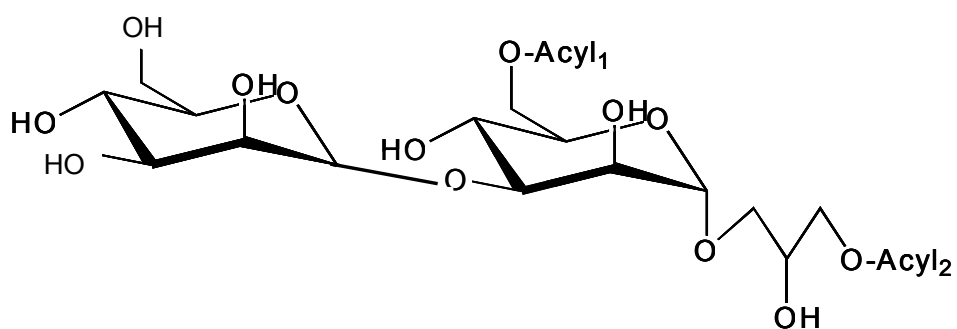
**Tabelle 3.18:** Kultivierungsergebnisse des *Micrococcus luteus* (Hel 12/2) auf einem KSW-Medium (Material und Methoden 3.2), Arbeitsvolumen 8 l

Prozessgröße	Ergebnis
Reaktorlaufzeit	56,00 h
BTM <sub>max</sub>	16,5 g/l
GGL.2 <sub>max</sub>	182,6 mg/l
P <sub>V</sub>	5,49 mg/(l·h)
μ <sub>max</sub>	0,12 1/h
Y <sub>P/X</sub>	11,04 mg/g
Y <sub>P/S</sub>	10,7 mg/g

### 3.9 Isolierung und Charakterisierung der Komponente GGL5

Nach der Anreicherung der Zellmasse von *Micrococcus luteus* (Hel 12/2) wurde der daraus gewonnene Zellextrakt chromatographisch in seine Bestandteile getrennt (Material und Methoden 2.9.2) und auf diese Weise in mehreren Schritten die Komponente GGL5 (Abbildung: 3.41) angereichert.

Die Strukturaufklärung des GGL5 erfolgte ähnlich der enzymatisch erhaltenen Produkte GGL.2a und GG2 sowie des Ausgangsmateriales GGL.2 durch eine Kombination der NMR-Spektroskopie und Massen- Spektrometrie. Eine Zuordnung der NMR Signale erfolgte über Kreuzpeaks der (<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H)-COSY und (<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H)-HBMC-Spektren. Auf diese Weise wurde zuerst die diacylierte Form des GGL5 bestätigt. Die Identifizierung der Zucker (α-Mannopyranose) ergab sich wie bei den anderen Komponenten über die jeweiligen J(HH) (Tabelle 7.31: 1,6) und <sup>1</sup>J(CH) Kopplungskonstanten. Die Acylierungspositionen am C6 der Mannose und am C3 des Glycerins sind durch kleine chemische Verschiebungen sichtbar.



**Abbildung 3.41:** Dimannosylglycoglycerolipid GGL5 (Mannopyranosyl(1 $\alpha$ -3)-6-acylmannopyranosyl(1 $\alpha$ -1)-3-acylglycerol)

## 4. Diskussion

Das in dieser Arbeit betrachtete *Microbacterium* spec. DSM 12583 wurde bei einem Screening aus dem Kalkschwamm *Halichondria panicea* (Mittelmeer, Küste) isoliert [Wicke 1999]. Der nach der 16S-rRNA-Sequenzierung als *Microbacterium* spec. DSM 12583 identifizierte Organismus lieferte ein interessantes Metabolitenspektrum. Er produziert intra- und extrazellulär ein antitumoral wirkendes Glucosylmannosylglycoglycerolipid [Lurtz, Lang 2004]. In der vorliegenden Arbeit wurden Wachstum und Metaboliten-Bildung betrachtet. Nach Versuchen im Schüttelkolben folgte ein erstes Scale-up für den Bioreaktor. Es galt im Weiteren in den Fermentationsversuchen den limitierenden Faktor für das Wachstum zu ermitteln, sowie die Produktivität in Form von Biomasse und Produkt zu steigern.

Die Diskussion dieser Arbeit wurde chronologisch nach dem Ergebnisstil aufgebaut. Sie beginnt mit den Schüttelkolbenexperimenten, gefolgt von den Fermentationsresultaten und der enzymatischen Modifikation des Produktes und den dazugehörigen Bioaktivitäten der Strukturen. Zum Schluss wird auf die beiden Isolate der Nordsee *Microbacterium* spec. Hel12/1 und *Micrococcus luteus* Hel 12/2 eingegangen.

### 4.1 Schüttelkolbenexperimente zur Medienoptimierung

Unabhängig davon, ob bei der Fermentation von Mikroorganismen primäre oder sekundäre Metaboliten das Produktionsziel darstellen, gilt es oft, zunächst hohe Biomassekonzentrationen zu erreichen [Risse et al. 2004]. Die geeignete Medienwahl spielt dabei eine sehr wichtige Rolle.

#### Medienpräparation

In früheren Experimenten wurde schon mit dem komplexen Medium „Marine Broth“ sowie mit dem definierten Medium SM1 nach Passeri (1992) gearbeitet. Mit der additiven Kohlenstoffquelle Glucose wurden erste Wachstums- und Optimierungsexperimente durchgeführt. Durch die Variation der eingesetzten C-Quelle zeigte sich,

dass Glycerin gegenüber Glucose bessere Resultate bezüglich Biomasse- und Metaboliten-Bildung hervorrief.

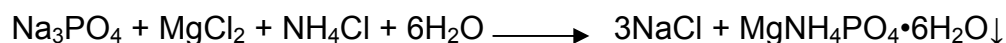
Bei unterschiedlicher Behandlung des Mediums (SM 1) traten jedoch erhebliche Differenzen im Wachstum auf. Bei Verwendung der Kohlenstoffquelle Glycerin zeigte sich, dass für ein gutes Wachstum alle Medienbestandteile zusammen autoklaviert werden sollten. Im Allgemeinen versucht man dies zu vermeiden, da sich während des Erhitzens die Bestandteile des Komplexanteils (z.B. Peptide, Proteine und Aminosäuren) mit Kohlenhydraten (Glucose) zu heterozyklischen Endprodukten verbinden können (Maillard-Reaktion).

Innerhalb des ersten Versuches wurden folgende Varianten der Medien- Präparation (SM 1) unterschieden: 1) Alle Bestandteile wurden vereinigt und erhitzt. 2) Die Salzlösung wurde getrennt von Glycerin, Hefeextrakt und Bacto Pepton autoklaviert. 3) Alle drei Komponenten, Salz-, Komplex- (Hefeextrakt, Bacto Pepton) und Glycerin-Lösung wurden getrennt erhitzt.

Erstaunlicherweise wurde beobachtet, dass bei der letzten Variante kein Wachstum feststellbar war. Bei der zweiten Kombination konnte nach einer verlängerten lag-Phase eine Vermehrung der Zellen des *Microbacterium spec.* verzeichnet werden. Das beste Ergebnis wurde jedoch mit der ersten Versuchsanordnung erzielt. Da in den Flüssigkeiten (Salz-, Komplex-, Glycerin- Lösung), wenn sie getrennt vorliegen, unterschiedliche pH-Werte existieren und der Wert von 7,5 erst nach der Vereinigung der Komponenten erreicht wird, sind die unterschiedlichen Verläufe in den ersten zwei Wachstumskurven auf Grund der verschiedenen pH-Werte der autoklavierten Lösungen zu vermuten. Nicht nur die Temperatur, sondern auch der pH-Wert stimuliert den Reaktionsfortschritt bei dem Verlauf einer Umsatzreaktion.

### **Ausfallen von Phosphat**

In den Vorversuchen wurde deutlich, dass die Ammonium-Konzentration in den Schüttelkolben nicht abnahm und dass der Einsatz von Phosphat zu Niederschlägen im Medium führte (Ergebnisse: Gl. 3.1).



Daher wurde eine Überprüfung dieser Medienbestandteile, sowie der Einfluss einer zugesetzten Spurenelementlösung im Rahmen der Medienoptimierung überprüft.

Die Grundkomponenten des Mediums ergeben wie gewünscht eine klare Flüssigkeit. Auf Grund des zu niedrigen pH-Wertes für den Mikroorganismus ist das Zudosieren von Lauge erforderlich. Dieser Schritt führt zur Bildung von Niederschlag (schwer lösliche Phosphate). Ähnliche Phänomene sind in der Arbeit von Ramm (2001) beschrieben worden. Da die ausgefallenen Kristalle für den Organismus nicht aufnehmbar sind, wurde ein Wachstumsversuch mit unfiltriertem und filtriertem Medium vorgenommen. Das Resultat zeigte, dass in Anwesenheit des Niederschlages eine annähernd doppelt so hohe Biomassekonzentration erreicht wurde. Durch die Senkung des pH-Wertes während des Wachstums konnte sich der Niederschlag in den Schüttelkolben während der Kultivierung wieder lösen, dadurch stand in den einzelnen Wachstumsphasen mehr Phosphat zur Verfügung.

Der Einsatz von Phosphat im Schüttelkolben zeigte in früheren Versuchen mit dem *Microbacterium spec.* eher eine Wachstumsinhibierung statt einer Steigerung. Aus verschiedenen Quellen ist jedoch die stimulierende Eigenschaft des Phosphates auf die Glycolipidbildung [Vollbrecht 1999, Frautz 1986] und die Beeinflussung des Produktspektrums mittels Phosphat [Benning et al. 1995] bekannt.

Im Konzentrationsprofil des Phosphates spiegelte sich das Abgleiten in den sauren Bereich des Medium deutlich wider. Während der Bioreaktorkultivierungen herrschte ein gleichmäßiger pH-Wert über den gesamten Kultivierungszeitraum; daher wird an dieser Stelle näher auf das Phosphatprofil eingegangen.

### **Ammonium-Problematik**

Ammonium wurde in früheren Versuchen (C-Quelle Glucose) als zusätzliche Stickstoffquelle gewählt und die optimale Konzentration mit 5 g/l Ammoniumchlorid gefunden. In diesem Versuch hatte das Salz keinen nennenswerten Einfluss auf die Biomasse- und Metabolit- Produktion. Die Niederschlagsmenge wurde jedoch durch das Fehlen des Salzes deutlich erhöht.

Ähnlich wie Phosphat schien die Anwesenheit von Ammonium im Medium keinen nennenswerten Einfluss auf die Biomasseproduktion sowie Glycolipidbildung zu besitzen.

Da beide Bestandteile mit den komplexen Bestandteilen zugeführt werden, ist im Medium eine Grundmenge vorhanden. Für die Schüttelkolbenkultivierungen konnte daher eine reduzierte Medienzusammensetzung ohne Ammoniumchlorid und Natriumhydrogenphosphat verwendet werden.

Das Verhalten änderte sich bei den Kultivierungen in Bioreaktoren und wird somit an anderer Stelle näher erläutert.

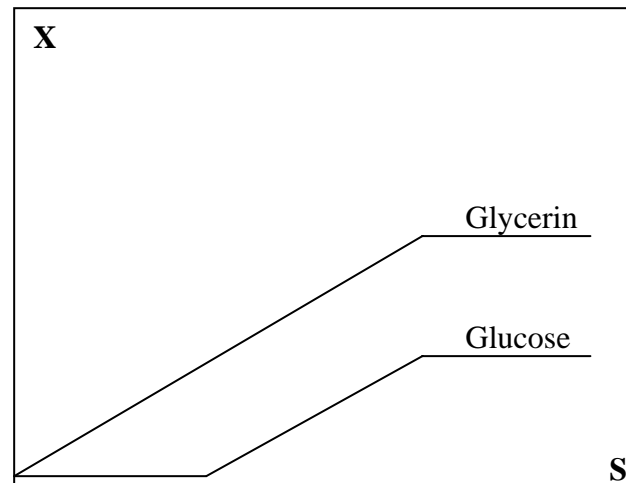
### **Spurenelemente**

Spurenelemente wie Zink, Eisen oder Brom können in verschiedenen Fällen für eine Variation im Metabolitenspektrum sorgen. So sind zum Beispiel bei der Herstellung von Tiacumicin durch den Austausch von KCl gegen KBr im Medium bromierte Formen des antibiotisch wirksamen Stoffes produziert worden [Hochlowski et al. 1998]. Der Einsatz von Eisen führte bei der Gattung *Ruegeria* zu einer Steigerung des Wachstums. Innerhalb der durchgeführten Versuche differierten die Werte für die Biomassen und die spezifischen Glycoglycerolipidausbeuten jedoch kaum (Abbildung 3.7).

### **Glycerinzugabe**

Damit überhaupt Wachstum während einer Kultivierung zu verzeichnen ist, benötigt der Organismus eine Energiequelle. Dazu dient am häufigsten Glucose. Sie wird bevorzugt glycolytisch über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg abgebaut [Wartenberg 1989]. *Microbacterium spec.* wächst auch auf Glycerin, welches neben Saccharose und Glucose für die höchste Produktausbeute verantwortlich war. Der Einsatz verschiedener Glycerinkonzentrationen im Schüttelkolben zeigte, dass schon geringe Mengen einen großen Einfluss auf die Produkt- und Biomassebildung besitzen. Entgegen den Versuchen mit Glucose, in denen erst nach einer Substratmenge von 10 g/l Steigerungen in der Biomasse- und Produktkonzentration auftraten, waren beim Glycerin schon kleine Mengen von unter einem Gramm ausreichend, um eine Produktanreicherung zu beobachten. Das Glycerin schien damit als Kohlenstoffquelle besser geeignet als Glucose. Da aus dem zugeführten Substrat augenscheinlich nur Zellmasse produziert wird und extrazelluläre Produkte eine untergeordnete Rolle spielen, müsste ein direkter Zusammenhang zwischen dem angebotenen Substrat und der Biomasse bestehen. In der Abbildung 4.1 wurde die eingesetzte Substratmenge über der entstandenen Biomasse aufgetragen.





**Abbildung 4.1:** Schema bezüglich der Zunahme der Biomasse (X) des *Microbacterium spec.* in Abhängigkeit von verschiedenen Substratkonzentrationen (S) bei der Kultivierung auf Glucose und Glycerin

Nach der Vorstellung von Monod [Wartenberg 1989] wird damit nur ein einzelnes Substrat (Glycerin) in ein spezielles Produkt (Zellmasse) überführt, so als würde eine Enzymreaktion vom Michaelis-Menten-Typ vorliegen. Nach dieser Theorie steigt die spezifische Wachstumsrate mit der eingesetzten Substratkonzentration bis zu einem maximalen Wert an. Anhand der Daten lässt sich über verschiedene graphische Auftragungen berechnen, bei welcher Substratkonzentration die halbmaximale Wachstumsrate erreicht wird. Da die Messmöglichkeiten im Schüttelkolben eingeschränkt waren und viele Parameter nicht berücksichtigt werden konnten, wurde diese Theorie im Fermenter näher betrachtet.

In der vorliegenden Arbeit stagniert das Wachstum ab einer bestimmten Substratkonzentration (Abbildung 3.9 und 4.1). Eine Ursache kann in diesem Fall beim gelösten Sauerstoff liegen. Da die Löslichkeit von Sauerstoff in Flüssigkeiten begrenzt ist, kann durch den Verbrauch eine Limitierung im Wachstum der Kultur hervorgerufen werden. Zusätzliches Substrat (Glycerin) könnte dadurch nicht mehr verstoffwechselt werden. Eine andere Möglichkeit wäre eine vorliegende Substrathemmung. Neben diesen Möglichkeiten soll an dieser Stelle noch kurz der pH-Wert als Ursache für das begrenzte Wachstum erwähnt werden. Sämtliche Schüttelkolbenkultivierungen wurden mit dem Eintritt in die stationäre Phase abgebrochen. Da durch die Verstoffwechselung des Glycerins der pH-Wert absank, konnte durch die veränderten Umgebungsbedingungen (pH-Wert < 5) das Wachstum stagnieren.

### Überprüfung weiterer C-Quellen

Neben den bereits überprüften C-Quellen wurden weitere Energielieferanten getestet. Durch die Substrate Glucose, Mannose und Glycerin, welche alle im Glycoglycerolipid vertreten sind, traten Steigerungen in der Biomasse- und Glycolipidproduktion auf. Da auch Fettsäuren einen wesentlichen Bestandteil des Metaboliten darstellen, wurden im nächsten Schritt hydrophobe Kohlenstoffquellen in Form von Ölen und Fettsäuren überprüft. Arbeiten mit dem Stamm *Tsukamurella* spec. zeigten, dass der Einsatz von Triglyceriden positiv auf die Glycolipidproduktion wirkte [Langer 2004].

Die Versuche mit *Microbacterium* spec. ergaben jedoch nur ein verhaltenes Wachstum und Ansteigen der Biomasse. Die Glycoglycerolipid-Produktion erreichte jedoch ähnlich gute Resultate wie beim Einsatz von geringen Glycerin-Mengen. Ob dieses Verhalten auf das im Triglycerid enthaltenen Glycerin zurückging, wurde überprüft. Dazu wurde das Seewasser (SM1) mit verschiedenen Triglyceriden versetzt und nach der Sterilisation auf dessen Gehalt an Glycerin überprüft (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1:** Gemessene Glycerinkonzentration verschiedener Triglyceride (Einsatzmenge: 20g/l) nach der Sterilisation des Mediums

Triglycerid	Messbare Glycerin-Konzentration
	[g/l]
Distelöl	0,26
Rapsöl	0,24
Sojaöl	0,3
Sonnenblumenöl	0,35

Da neben den Triglyceriden auch Glycerin im Medium frei verfügbar vorlag, waren das verhaltene Wachstum und die gute Produktbildung auf das im Medium vorhandene Glycerin zurückzuführen. Freie Fettsäuren können von dem *Microbacterium* nicht als Energiequelle verwendet werden. Dieses Verhalten war nicht ungewöhnlich, da Fettsäuren in einigen Fällen schon in geringen Konzentrationen toxisch auf Zellen wirken können [Hommel, Ratledge 1993].

---

### **Zusammenfassung der Schüttelkolbenversuche**

Zusammenfassend gilt für die Schüttelkolbenversuche: das Medium SM1 kann um Phosphat und Ammonium reduziert eingesetzt werden. Die Überprüfung weiterer Kohlenstoffquellen (Triglyceride) bestätigte: das beste Wachstum und Produktbildung wurden durch das freigesetzte Substrat Glycerin hervorgerufen.

## **4.2 Bioreaktorexperimente zur Medienoptimierung**

Nach den grundlegenden Experimenten im Schüttelkolben erfolgte ein Scale-up in einem 10 Liter Bioreaktor. Der Bioreaktor bietet den Vorteil, Prozessgrößen wie den pH-Wert oder den Sauerstoffpartialdruck im Medium zu kontrollieren und zu steuern. Dadurch können die Daten der Wachstums- und Produktbildung unter verschiedenen Bedingungen besser verglichen werden.

### **Ausgangssituation**

Am Anfang wurden zwei grundlegende Versuche gegenübergestellt: eine Fermentation mit und ohne Zusatz von Natriumhydrogenphosphat.

In früheren Versuchen mit *Microbacterium* spec. und dem Einsatz der Kohlenstoffquelle Glucose verkürzte sich bei zusätzlicher Phosphat-Gabe die Kultivierungszeit. Die Ausbeuten an Biomasse und Glycoglycerolipid konnten dadurch ebenfalls gesteigert werden [Wicke 1999]. In den Schüttelkolben-Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch ein verändertes Wachstums- und Produktbildungs-Verhalten, das durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose auf Glycerin hervorgerufen wurde. So konnte im Grundmedium auf zusätzliches Ammoniumchlorid und Natriumhydrogenphosphat verzichtet werden.

Im ersten Fermentationsversuch mit Glycerin und pH 7,5 bestätigte sich die Beobachtung von Wicke (1999) bezüglich des Natriumhydrogenphosphat-Zusatzes. Es war eine Verkürzung der Reaktorlaufzeit sowie eine Zunahme der maximalen spezifischen Wachstumsrate durch zusätzliches Natriumhydrogenphosphat zu verzeichnen (Tabelle 3.3). Die stimulierende Eigenschaft des Phosphates auf das Wachstum von marinen Bakterien und Hefen wurde ebenfalls von Holversen und Kronberg [Holverson et al. 2002] beschrieben. Für weitere Versuche fand daher

wieder eine Erweiterung des Mediums um Natriumhydrogenphosphat und Ammoniumchlorid statt (Material und Methoden 2.3.2).

### **Variation des pH-Wertes**

Bei den ersten Fermentationen (Tabelle 3.3) wurde mit einem konstantem pH-Wert von 7,5 gearbeitet. In den Schüttelkolbenversuchen war dieser frei laufend und sank bis auf einen Wert von 4,8. Der pH-Wert von natürlichem Seewasser kann im Bereich von 7 bis 8,5 variieren [Riedel 1983, Ho 1998]. Ein Absinken des pH-Wertes auf 4,8 könnte demnach das Wachstum des Organismus im Schüttelkolben hemmen.

Um diesen Bereich näher zu untersuchen, wurden in den folgenden Experimenten Kultivierungen bei unterschiedlichen pH-Werten betrachtet. Der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum und die Produktbildung einer Kultur wurden zum Beispiel von Mountfort und Pybus [1992] sowie von Glimour und McCallum [Glimour et al. 1975] beschrieben. In der Arbeit von Mountfort und Pybus [1992] führte die Erhöhung des pH-Wertes zu einer verstärkten Produktion des untersuchten Metaboliten (GABA). Gamma-Amino-Buttersäure fungiert im zentralen Nervensystem als Neurotransmitter und wird von dem marinen Bakterium *Pseudomonas* gebildet. Da das natürliche Seewasser mit einem pH-Wert von 7 bis 8,5 eher zum basischen tendiert, wurde beim *Microbacterium spec.* erwartet, dass der pH-Wert mit 7,5 gut gewählt wurde. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes würde das Ausfallen von schwerlöslichen Phosphaten unterstützen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Fermentationen wurden im pH-Bereich von 5,5 bis 7,5 durchgeführt. Das beste Resultat trat bei pH 6,5 auf. Unter diesen Bedingungen bildete sich eine maximale Biomasse von 14 g/l (Tabelle 3.4). Die dazugehörige spezifische Produktion an Glycoglycerolipid pro Biomasse lag bei 46 mg/g. Durch die Absenkung des pH-Wertes wurde auch die Menge an gelöstem Phosphat erhöht (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2:** Gehalt an gelöstem Phosphat bei Reaktorkultivierungen des *Microbacterium spec.* mit variierendem pH-Wert, Eingesetzte Konzentration: 0,89 g/l Natriumhydrogenphosphat

pH – Wert des Reaktors	gemessene $\text{PO}_4^{3-}$ - Konzentration [mg/l]
Freilaufend	94,15
7,5	104,35
6,5	408,91
5,5	431,02

An dieser Stelle soll kurz darauf hingewiesen werden, dass mit den Werten für die Phosphat-Konzentration noch nicht die theoretisch maximale Menge gelöst wurde. Diese betrug bei einer Einwaage von 0,89 g/l Natriumhydrogenphosphat 595 mg/l Phosphat. Zusätzlich muss die Phosphat-Konzentration aus dem Komplexanteil mit eingerechnet werden (120 mg/l). Ein geringer Teil des Salzes liegt demnach nicht in dissoziierter Form vor.

Aus der Literatur sind mehrere Seewasser-Medien [Sokoll 1999, Dolej 1998, Landy et al. 1948] bekannt, bei denen der Anfangsbereich des pH-Wertes bei 7,5 liegt. In diesem Milieu herrschen für viele Organismen die besten Ausgangsbedingungen. Das Absinken der gebildeten Biomasse bei einem pH-Wert von 5,5 wäre demnach durch den für die Organismen zu niedrigen pH-Bereich zu begründen.

Bei dem Vergleich des Versuches mit dem frei laufendem pH-Wert und den Ergebnissen aus den Schüttelkolben war festzustellen, dass in beiden Fällen das angebotene Glycerin nicht vollständig verbraucht wurde. Eine Sauerstofflimitation ist jedoch nicht die Ursache, da diese durch den Einsatz einer online Abgasanalyse sowie einer online arbeitenden  $\text{pO}_2$  – Elektrode überprüft wurde. Zu keinem Zeitpunkt traten während der Fermentationen Sauerstofflimitationen auf. Die eingeschränkte Stoffwechselaktivität konnte daher aus dem Absinken des pH-Wertes resultieren. In der Arbeit von Takada und Sasaki [Takada et al. 1991] konnte die Stoffwechselaktivität in Form der ATP-Synthese durch die Absenkung des pH-Wertes gesteigert werden. Beim *Microbacterium spec.* trat schon durch einen konstanten pH-Wert von 7,5 eine Stimulierung des Stoffwechsels (verstärkter Glycerinabbau) auf.

In den folgenden Experimenten wurde daraufhin beim pH – Wert  $6,5 \pm 0,2$  gearbeitet.

---

## Variation des Phosphatgehaltes

In den vorherigen Ausführungen zum Wachstum des Organismus bei wechselndem pH-Wert wurde auf die ansteigende Konzentration des Phosphates mit saurer werdendem Medium hingewiesen. Phosphat wird von den Zellen primär für die Synthese von Nucleinsäuren und Phospholipiden verwendet. Für die bessere Freisetzung der Ionen unter veränderten Ausgangsbedingungen ( $\text{pH} = 6,5 \pm 0,2$ ), wurde eine Fermentationsreihe mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen durchgeführt, u.a. auch Konzentrationen über 0,89 g/l Natriumhydrogenphosphat. Die anfangs zu beobachtende Niederschlagsbildung hatte keine negativen Folgen bei der Kultivierung.

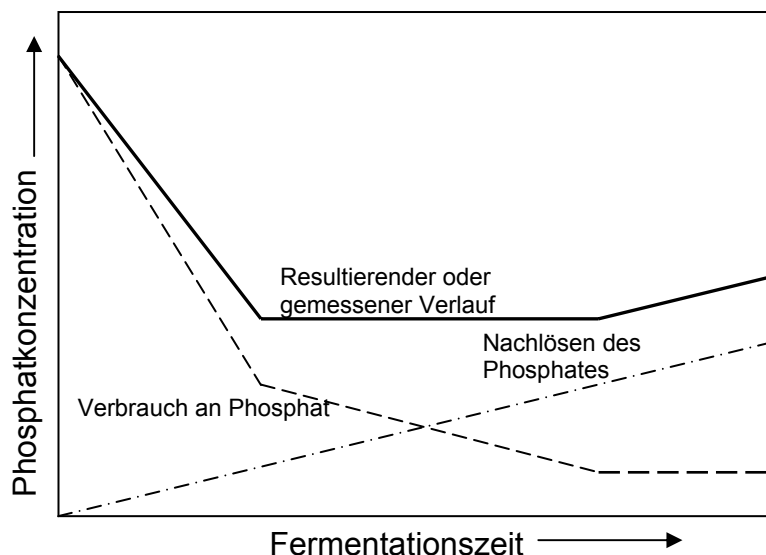
Im Ausgangsversuch zeigte sich, dass durch die Verwendung des Phosphates die Wachstumsrate gesteigert werden konnte. Mit zunehmender Phosphatkonzentration stieg die maximale spezifische Wachstumsrate (Tabelle 3.5). Die maximale Biomassekonzentration wurde jedoch bei 0,89 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  gefunden. Ähnlich wie bei der Fermentation mit dem frei laufendem pH-Wert wurde in den Kultivierungen ohne Phosphat oder mit einer geringen Konzentration von 150 mg/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  die zugesetzte Kohlenstoffquelle (Glycerin) nicht vollständig aufgebraucht.

Es zeigte sich allerdings, dass das Phosphat in den ersten Stunden stark reduziert, der Wert Null aber nicht erreicht wird (Abbildung 3.6 und 3.12). Eine Phosphatlimitierung, welche das Wachstum begrenzte, kann daher nicht vorgelegen haben.

Das Profil des Konzentrationsverlaufes im Bioreaktor (Abbildung 3.12) hatte sich gegenüber dem im Schüttelkolben (Abbildung 3.6) verändert. In diesen Versuchen sank die Phosphatkonzentration auf einen Minimalwert, um dann wieder anzusteigen. Bei den Kultivierungen im Bioreaktor kam es nach einer Reduzierung der Phosphatkonzentration zur Ausbildung eines Plateaus und erst mit dem Übergang der Kultur in die stationäre Phase zu einem erneuten Anstieg der Werte. In der Diskussion um die Niederschlagsbildung am Anfang der Versuche wurde darauf hingewiesen, dass durch das Absenken des pH-Wertes ein Lösen des Niederschlages erfolgt und dadurch die zu messende Phosphatmenge steigt. Da durch den Abbau des Glycerins der Abfall des pH-Wertes durch Säurebildung im

Schüttelkolben bedingt wurde, konnte somit nach dem Verbrauch ein sofortiger Anstieg dieser Größe festgestellt werden. Der pH-Wert im Bioreaktor wurde demgegenüber konstant gehalten und der erneute Anstieg der Phosphat-Konzentration war nicht zu erwarten. Berücksichtigt man, dass der Verbrauch an Phosphat in den Wachstumsphasen unterschiedlich ist und dass ein Nachlösen dieser Komponente konstant erfolgt, kann die Kurve nachgestellt werden (Abbildung 4.2).

Im Schüttelkolben war dies auf Grund des schnell absinkenden pH-Wertes nicht möglich. Die Löslichkeit überwog gegenüber dem Verbrauch an Phosphat. Wie bereits erwähnt, werden Phosphate vor allem für den Zellaufbau (Nucleinsäuren, Phospholipiden) benötigt. Je nach Zellzyklusphase wird demnach unterschiedlich viel Phosphat benötigt.

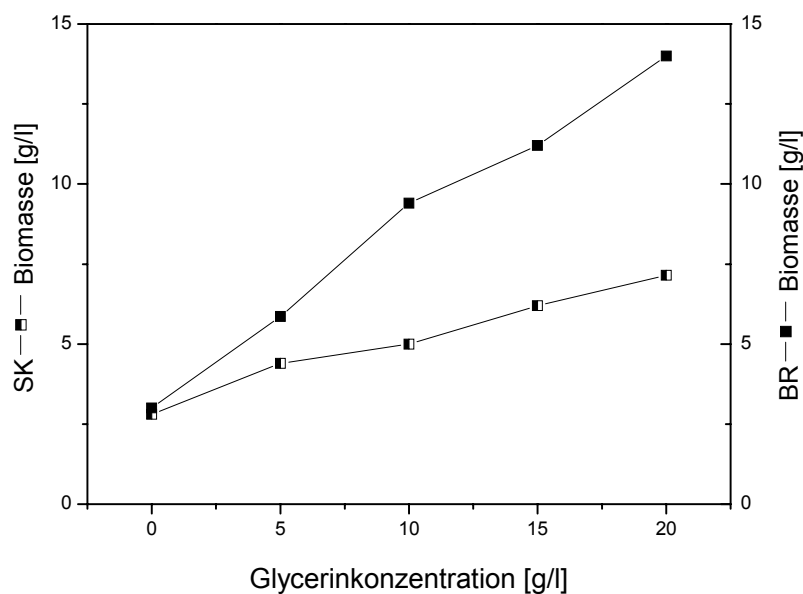


**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung des Phosphat-Konzentrationsprofils über die Zeit bei nicht vollständig gelöstem Natriumhydrogenphosphat

### Variation der Glycerinkonzentration

Die nächste Größe, die im Bioreaktor variiert wurde, war die Glycerinkonzentration. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Glycerin als Hauptkohlenstoffquelle favorisiert und sollte als Energielieferant für die Synthese der Zellbausteine dienen. Im Schüttelkolben gab es einen direkten Zusammenhang zwischen der gebildeten Biomasse und der eingesetzten Glycerinmenge. Für die Kultivierungen im Bioreaktor wurde ein ähnliches Verhalten erwartet. Diese Vermutung konnte bestätigt werden. Bis zu einer Konzentration von 20 g/l Glycerin lag eine direkte Abhängigkeit zur

gebildeten Biomasse vor (Abbildung 4.3). Bei einer Konzentration von 30 g/l Glycerin war die Tendenz für die Biomasse abnehmend. Daher wurden im Konzentrationsprofil nur die Werte bis 20 g/l eingesetztem Glycerin aufgetragen. Der Unterschied zu den Kultivierungen im Schüttelkolben lag in den Biomasseausbeuten. Die Werte, welche bei den Fermentationen auftraten, lagen teilweise um das Doppelte höher als bei den Schüttelkolbenkultivierungen.



**Abbildung 4.3:** Maximale Biomassekonzentrationen aus Schüttelkolben- (SK) und Bioreaktorkultivierungen (BR) des *Microbacterium spec.* mit variierender Glycerinkonzentration

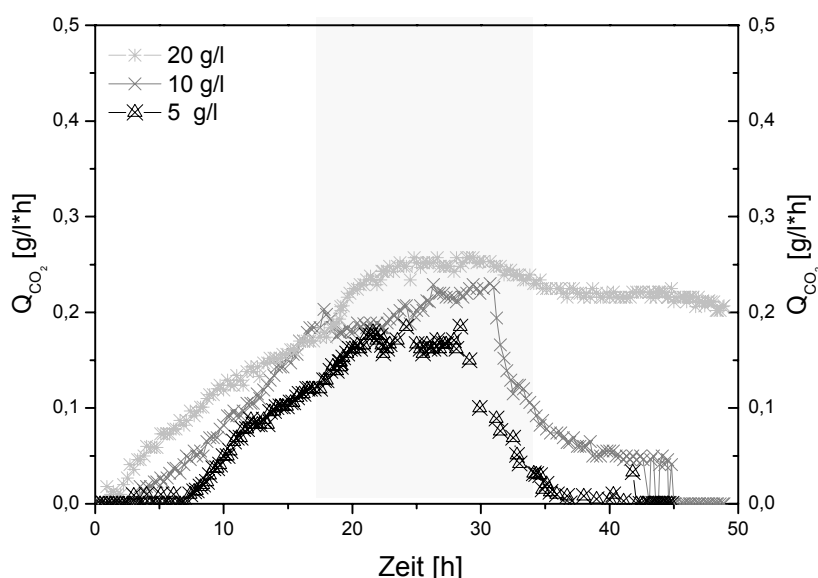
Ähnliche Vergleiche wurden bereits mit der Kohlenstoffquelle Glucose durchgeführt. Der Unterschied zwischen der Biomasse im Schüttelkolben (BTM = 5,3 g/l) und der im Bioreaktor (BTM = 12 g/l) variierte um den Faktor zwei [Wicke 1999].

Da in den Schüttelkolben das Glycerin nie vollständig aufgebraucht wurde, war der Zuwachs der Biomasse im Bioreaktor nicht ungewöhnlich. Im Bioreaktor wurde das Glycerin bis zur Konzentration von 20 g/l vollständig verwertet. Überschüssiges Glycerin aus dem Schüttelkolben konnte im Reaktor in Zellmasse umgewandelt werden.

Mit dem Anstieg der Zellmassenkonzentration wurde auch ein Anstieg der maximalen spezifischen Wachstumsrate erwartet. Dieses Verhalten ging aus den Kultivierungen jedoch nicht hervor. Die Wachstumsrate zeigte während der Kultivierungen mit



unterschiedlichem Glycingehalt kleinste Schwankungen und bewegte sich um einen Wert von  $0,137 \text{ h}^{-1}$ . Auffallend war das Profil der Abgasanalyse von den einzelnen Kultivierungen. In der Abbildung 4.4 sind die Daten für die Kohlendioxidbildungsrate von drei verschiedenen Kultivierungen abgebildet. Der einzige Variationsparameter bestand in der eingesetzten Glycerinkonzentration.



**Abbildung 4.4:** Online-Daten der Kohlendioxidbildungsrate von drei Kultivierungen des *Microbacterium spec.* mit verschiedenem Glycingehalt, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $500 \text{ min}^{-1}$ ,  $0,4 \text{ l/l}\cdot\text{min}$ , pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3), C-Quelle Glycerin, Blattrührer

Alle drei Kultivierungen erreichten nach ungefähr 20 Stunden ein Maximum in der Kohlendioxidbildungsrate (Abbildung 4.4). Die leichten Unterschiede am Anfang der Kultivierungen (0 bis 10 Stunden) könnten auf die Vorkultur zurückzuführen sein. Nach Erreichen dieses Maximums schwankte die Kohlendioxidbildungsrate um den Wert  $0,25 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ . Dieses Verhalten war eher aus Fed-Batch Kultivierungen bekannt [Vollbrecht 1999]. Der Zeitbereich, in welchem die Kohlendioxidrate konstant blieb, nahm mit steigender Konzentration an Glycerin zu. Im Zeitbereich nach 30 Stunden war eine Abnahme der Werte festzustellen. Bei einer Standardkultivierung steigt die Kohlendioxidbildungsrate an, bis sie am Ende der exponentiellen Phase ihr Maximum erreicht hat und sinkt dann wieder ab. Entgegengesetzt dazu verhält sich der  $\text{pO}_2$ . Mit Erreichen des Minimums wird das Ende des exponentiellen Wachstums angegeben und er steigt wieder an.

Weiterhin ist zu beachten, dass die eingesetzte Kohlenstoffquelle einerseits zum Aufbau der Zellmasse benötigt, andererseits in Kohlendioxid umgewandelt wird. Da sich die Maxima der Kohlendioxidbildungsrate kaum unterschieden, war davon auszugehen, dass Glycerin nicht als Hauptkohlenstoffquelle verstoffwechselt wurde. Zum Zeitpunkt der maximalen Kohlendioxidbildungsrate begann der Glycerinabbau (Abbildung 3.12). In den ersten Stunden der Kultivierung blieb die Konzentration des Glycerins bei allen Kultivierungen konstant. Nach ungefähr 10 bis 15 Stunden erfolgte ein leichter Abbau, der in einen linearen Verlauf überging. Dieser schien ebenfalls bei allen Kultivierungen ähnlich zu sein, was auf einen konstanten Glycerinverbrauch von ungefähr 0,5 g/h schließen lassen würde.

### **Sauerstoff- und Energie-Eintrag**

Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Fermentation von Mikroorganismen ist der Sauerstoff- und Energie-Eintrag. Beide Größen sind im volumenbezogenen Leistungseintrag zusammengefasst und für ein erfolgreiches Scale-up unerlässlich. Es gibt nur wenige Fermentationen von marinen Bakterien, welche alle biotechnologisch wichtigen Daten enthalten. Angaben von Kultivierungen im größeren Maßstab (1000 l) wurden zum Beispiel von Izumida [Izumida et al. 1997] zur Herstellung von Hydroxyakalone oder von Acebal [Acebal et al. 1999] für die Produktion von Agrochelin beschrieben. Des Weiteren gibt es wenige Daten über die Empfindlichkeit der marinen Bakterien gegenüber Scherstress. Da der Organismus in seinem natürlichen Habitat ebenfalls verschiedensten Strömungen ausgesetzt ist, liegt es nahe, die Rührerwahl oder das Fermentersystem genauer zu betrachten.

In den Versuchen wurde mit verschiedenen Begasungsraten, sowie mit zwei unterschiedlichen Fermentationssystemen gearbeitet. Dabei zeigten sich Wachstumsunterschiede zwischen dem Umwurfrührsystem und dem Blattrührsystem. In technischer Hinsicht unterscheiden sich die beiden Varianten in ihren differentiellen Strömungsprofilen. Im Umwurfrührreaktor wird ein tangentiales, scherarmes Strömungsprofil ausgebildet und die Verweilzeit des in die Flüssigkeit eingetragenen Sauerstoffes erhöht sich. Gegensätzlich dazu wird durch den Blattrührer ein axiales, turbulentes Strömungsfeld erzeugt, wodurch sich die Scherung, die auf die Partikel wirkt, erhöht.

Da es sich beim *Microbacterium spec.* um einen aeroben Organismus handelt, war der Sauerstoffeintrag unerlässlich. Dieser wurde in Form von unterschiedlichen

Begasungsraten variiert. Übersteigt der Sauerstoffverbrauch durch die Zellen die Nachlieferung, so erreicht die Lösungsgeschwindigkeit des Sauerstoffs einen Maximalwert [Ward 1994, Muttzal 1994]. Der Organismus selbst kommt in die Sauerstofflimitation. Bei den Kultivierungen im Schüttelkolben wird eine sehr schlechte Sauerstoffversorgung erreicht, da die Diffusion durch den Wattestopfen begrenzt ist. Bei sehr hohen Umdrehungszahlen kann im Schüttelkolben maximal ein Viertel der im Bioreaktor möglichen Sauerstofftransportrate erreicht werden. In den meisten Fällen ist daher im Schüttelkolben der Sauerstoffeintrag die das Wachstum limitierende Größe. Der aufgenommene Sauerstoff ist in der Zelle für die Energiegewinnung, für die Synthesereaktionen, für den Zellmassenaufbau und für den Erhaltungsstoffwechsel notwendig.

Die Resultate dieses Versuches haben gezeigt, dass sich bei dem *Microbacterium* spec. eine geringe Rührerdrehzahl ( $300 \text{ min}^{-1}$ ) mit erhöhter Begasungsrate ( $0,6 \text{ l/l}\cdot\text{min}$ ) negativ auswirkte. In dem entgegengesetzten Fall, in welchem mit einer Rührerdrehzahl von  $700 \text{ min}^{-1}$  und einer Begasungsrate von  $0,2 \text{ l/l}\cdot\text{min}$  gearbeitet wurde, traten ebenfalls negative Tendenzen bezüglich der Biomassebildung auf.

Ein Vergleich der beiden Fermentersysteme zeigte, dass der Organismus bei dem Umwurfsystem eine wesentlich längere Kultivierungszeit benötigte (74 h), was negative Auswirkungen bezüglich der Produktivität zur Folge hatte. Weiterhin wurde nur eine maximale Biomasse von  $12 \text{ g/l}$  erreicht.

Das beste Resultat (Biomasse:  $14 \text{ g/l}$ , spezifische Produktbildung:  $46 \text{ mg/g}$ ) trat bei dem Blattrührsystem, einer Drehzahl von  $500 \text{ min}^{-1}$  und einer Begasungsrate von  $0,4 \text{ l/l}\cdot\text{min}$  auf. Ein ähnlich gutes Resultat bezogen auf die spezifische Produktausbeute ( $46 \text{ mg/g}$ ) wurde nur mit den Einstellungen von  $400 \text{ min}^{-1}$  und  $0,4 \text{ l/l}\cdot\text{min}$  gewonnen. Der Nachteil lag hier in einer geringeren Ausbeute an Biomasse.

Die Vermutung, dass der Organismus auf unterschiedliche Reaktorcharakteristika reagiert, wurde bestätigt. Die Scherung spielt bei den Fermentationen jedoch eine untergeordnete Rolle.

### Repeated-Batch Fermentationen

In der Arbeit von Giudici [Giudici et al. 2003] führte das Zusetzen von Glucose in unterschiedlichen Raten und Zeiträumen entweder zum Erhalt der Biomasse bzw. zu ihrer Konzentrationserhöhung. Ähnliche Versuche wurden in der Arbeit zur

Modellierung von einem Fed-Batch Prozess von Zangirolami [Zangirolami et al. 1996] beschrieben. Das Zusetzen von Glycerin führte zu keiner weiteren Steigerung der Biomasse bzw. zu deren Erhalt. Da der limitierende Faktor der Kultivierung zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch ungeklärt war, wurde im nächsten Experiment die Standardkulturlösung zugesetzt. Ein Teil der vorherigen Kultur (Erneuerungsvolumen 4 l) verblieb als Inokulum im Fermenter (Repeated-Batch). Die Beobachtung aller Kultivierungsparameter sollte weiteren Aufschluss über diese Größe bringen. Ähnlich dem Ausschlussverfahren sollten am Ende die möglichen limitierenden Faktoren stark eingegrenzt sein. Nach jedem Wechsel der Kulturlösung konnte ein deutlicher Anstieg der Biomasse und des Glycerinabbaus beobachtet werden. Da das alleinige Zudosieren von Glycerin zu keinem Abbau dieser Größe führte, musste ein anderer Medienbestandteil dessen Abbau stimulieren. Ein Unterschied zur normalen Batch-Kultivierung lag im Zeitpunkt des Produktabbaus. Dieser konnte in die stationäre Phase eingeordnet werden und nicht wie zuvor in die Übergangsphase. Es ist jedoch zu keinem Zeitpunkt des Verlaufes eine Glycerinkonzentration von Null erreicht worden. Nachdem auch keine der anderen Größen (Ammonium, Phosphat, usw.) den Wert Null erreichten, musste der limitierende Faktor in den Komplexbestandteilen zu finden sein.

### **Kontinuierliche Fermentation**

Würden die Komplexbestandteile kontinuierlich durch frische Nährlösung zudosiert, müsste die Zellmasse sich erhöhen oder einen konstanten Wert anstreben und der Produktabbau könnte hinausgezögert werden. Es wurde daher der Versuch unternommen, in einer kontinuierlichen Kultur die Nährlösung mit einer Rate von  $0,04 \text{ h}^{-1}$  zuzuführen. Mit dieser sehr geringen Rate wurde stetig Komplexlösung nachgeliefert. Die Glycerinkonzentration wirkte in diesem Fall limitierend. Trotz der Glycerinlimitation erfolgte der Produktabbau in geringerem Maße als zuvor beim Standard-Batch-Prozess. Der Wert der Kohlendioxidbildungsrate konnte über einen längeren Zeitbereich konstant gehalten werden, was als Zeichen für eine ausreichende Nährstoffversorgung angesehen wurde. Mit der Abnahme dieser Größe trat ebenfalls ein verstärkter Produktabbau auf. Da diese Abnahme nicht auf den Glycerinverbrauch zurückzuführen war, war auch die Abnahme des Produktes nicht an den Verbrauch des Glycerins gekoppelt, sondern an andere Phänomene. Diese Aussage kann durch die Fermentationen auf reinem MB-Medium gestützt

werden. In dem Medium sind außer den im Meereswasser enthaltenen Salzen nur anteilig Hefeextrakt und Bacto Pepton enthalten. Die Bildung der Biomasse erfolgte über einen Zeitraum von 170 Stunden. Die stationäre Wachstumsphase wird jedoch schon nach 50 Stunden erreicht, einem Zeitpunkt, an dem auch die Produktion des GGL.2 dem Maximum entgegen strebt. Die Konzentration an GGL.2 wird danach über einen Zeitraum von 100 Stunden gehalten, ohne dass es zu einem starken Abbau des Produktes kommt [Wicke 1999].

Für eine kontinuierliche Kultivierung unter optimalen Bedingungen müssen mehr Daten über die Wachstumsparameter vorliegen.

### **Zusatz von komplexen Bestandteilen**

Nach dem Ausschlussverfahren eingegrenzt, wurde der limitierende Faktor für die Kultivierung des *Microbacterium spec.* im Komplexanteil der Nährlösung vermutet. Von verschiedenen Stämmen ist bekannt, dass sie freie Aminosäuren in Konzentrationen von mindestens 1 mg/l zum Wachstum benötigen [Baumann et al. 1984]. Im Fall des marinen Bakteriums *Alteromonas putrefaciens* führte die Zudosierung von Hefeextrakt und Bacto Pepton (1/2) zu einer Erhöhung der Zellkonzentration von 28 g/l auf 45 g/l Biomasse [Hüners 1999, Hibiono et al. 1993].

Die Bestandteile von Hefeextrakt und Bacto Peptone, welche im Verhältnis von eins zu eins und in einer Konzentration von jeweils 3,5 g/l eingesetzt wurden, sind in der folgenden Tabelle 4.3 aufgelistet. Frühere Untersuchungen zeigten, dass durch den Einsatz von Tryptophan und Phenylalanin eine Anreicherung von Anthranilsäure und Phenyllessigsäure stattfand. Eine Steigerung bezüglich der Biomasseproduktion war jedoch nicht zu beobachten [Wicke 1999]. Da beide Metaboliten vom *Microbacterium spec.* bei Anwesenheit von Glucose nicht produziert wurden, könnten beide Strukturen aus der Verstoffwechselung der Aminosäuren hervorgehen.

**Tabelle 4.3:** Zusammensetzung von Hefeextrakt und Bacto Pepton nach Hersteller – Angaben (Difco)

Bestandteil	Hefeextrakt	Bacto Pepton
Vitamine	Biotin ( 1,0 µg/g)	Biotin ( 2,5 µg/g)
	Nicotinsäure (280,0 µg/g)	Nicotinsäure (35,0 µg/g)
	Thiamin ( 3,0 µg/g)	
	Pyridoxin ( 20,0 µg/g)	Pyridoxin ( 2,5 µg/g)
	Riboflavin ( 20,0 µg/g)	Riboflavin ( 4,0 µg/g)
Aminosäuren	Arginin ( 10,0 mg/g)	Arginin ( 8,0 mg/g)
	Asparagin-säure ( 50,0 mg/g)	Asparagin-säure ( 6,0 mg/g)
	Glutamin-säure ( 65,0 mg/g)	Glutamin-säure (11,0 mg/g)
	Glycin ( 25,0 mg/g)	Glycin (23,0 mg/g)
	Histidin ( 10,0 mg/g)	Histidin ( 1,0 mg/g)
	Isoleucin ( 30,0 mg/g)	Isoleucin ( 2,0 mg/g)
	Leucin ( 35,0 mg/g)	Leucin ( 3,5 mg/g)
	Lysin ( 40,0 mg/g)	Lysin ( 4,5 mg/g)
	Methionin ( 10,0 mg/g)	Methionin ( 1,0 mg/g)
	Phenylalanin ( 20,0 mg/g)	Phenylalanin ( 2,5 mg/g)
	Threonin ( 35,0 mg/g)	Threonin ( 1,5 mg/g)
	Tyrosin ( 5,0 mg/g)	Tyrosin ( 1,0 mg/g)
	Valin ( 35,0 mg/g)	Valin ( 3,0 mg/g)
		Cystin* ( 0,2 mg/g)
		Tryptophan ( 0,4 mg/g)
Spurenelemente	Cu ( 19,0 µg/g)	Cu (17,0 µg/g)
	Mn ( 7,8 µg/g)	Mn ( 8,6 µg/g)
	Fe ( 16,0 µg/g)	Fe (15,0 µg/g)
	Zn ( 88,0 µg/g)	Zn (18,0 µg/g)

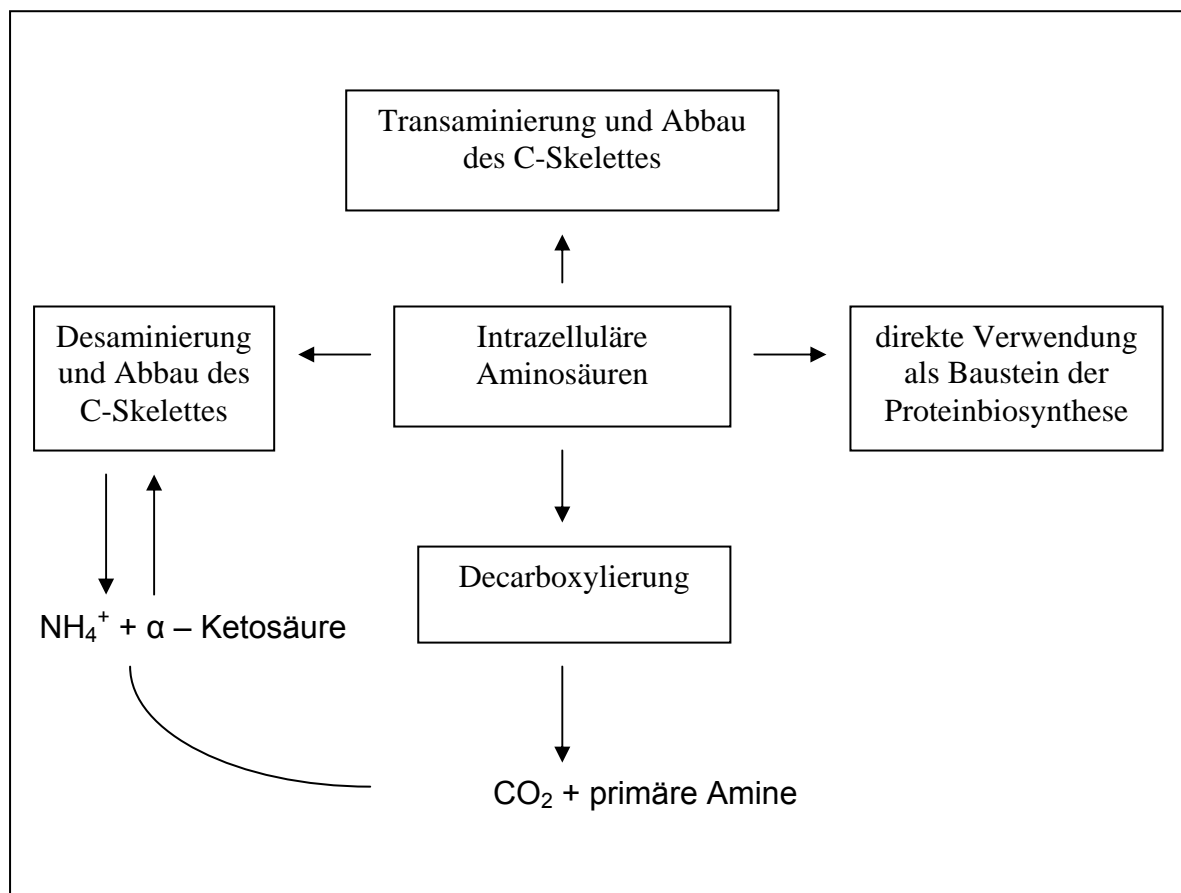
\* Dipeptid

Der Anteil der freien Aminosäuren in den komplexen Bestandteilen beträgt damit ungefähr 30 %. Bei der Verwertung dieser Aminosäuren ist ein deutlicher Anstieg des pH-Wertes zu beobachten, da ein geringer Teil des Aminosäurestickstoffes nicht als Stickstoffquelle verwertet wird. Dieser wird in Form von  $\text{NH}_4^+$  bzw.  $\text{NH}_3$  als Produkt der oxidativen Desaminierung freigesetzt. Je nach verfügbarer Stickstoffquelle werden unterschiedliche Enzymsysteme für die Verwertbarkeit exprimiert [Fisher 1999].

In einer Kultivierung mit freilaufendem pH-Wert konnte diese Aussage bestätigt werden. In den ersten 10 Stunden stieg der pH-Wert von 6,5 auf 7. Obwohl der zu

messende Anstieg nicht sehr groß war, muss berücksichtigt werden, dass durch den Verbrauch der Kohlenstoffquelle Glycerin eine Absenkung des pH-Wertes dem Ansteigen entgegen wirkte. Zur weiteren Unterstützung sei auf die Daten des Ammoniumverlaufes bei den Schüttelkolbenkultivierungen verwiesen. Teilweise traten Schwankungen auf, die den Wert der eingesetzten Ammonium-Konzentration überstiegen (Abbildung 3.6).

Die Aminosäuren werden entweder in die Zellproteine eingebaut oder auf speziellen Stoffwechselwegen desaminiert, in den Intermediärstoffwechsel eingeschleust und endoxidiert. Sie können dann als Energiequelle genutzt und über den Citratcyclus weiterverwertet werden. Eine schematische Darstellung der verschiedenen Stoffwechselschritte bietet die Abbildung 4.5.



**Abbildung 4.5:** Mögliche Stoffwechselschritte bei der Metabolisierung von Aminosäuren modifiziert nach Hüners [Hüners 1999]

Die Ergebnisse der Bioreaktorkultivierungen haben gezeigt, dass die Aminosäuren Asparagin, Histidin und Threonin bevorzugt aufgenommen werden. An Hand der

Abbildung 3.21, in der eine Kultivierung mit 40 g/l Komplex dargestellt wurde, ist deutlich zu erkennen, dass mit der Limitierung der Aminosäure Asparagin eine Veränderung in den Abgasdaten auftritt, sowie eine erste Diauxie beim  $pO_2$ . Zum späteren Zeitpunkt, an dem die Kohlendioxidbildungsrate ihr Maximum erreichte, wurden auch die anderen Aminosäuren wie Threonin oder Histidin vollständig verbraucht. Das Asparagin wird von der Asparaginase zu  $NH_4^+$  und Aspartat hydrolysiert, welches anschließend transaminiert wird. Arginin wird über Glutamat- $\gamma$ -semialdehyd zu Glutamat oxidiert und kann auf diese Weise direkt in den Citratcyclus eingeschleust werden. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Threonins kann direkt in Ammonium umgewandelt werden. Das entstehende Endprodukt Aminoacrylat kann sofort mit Wasser zu Pyruvat und Ammonium reagieren.

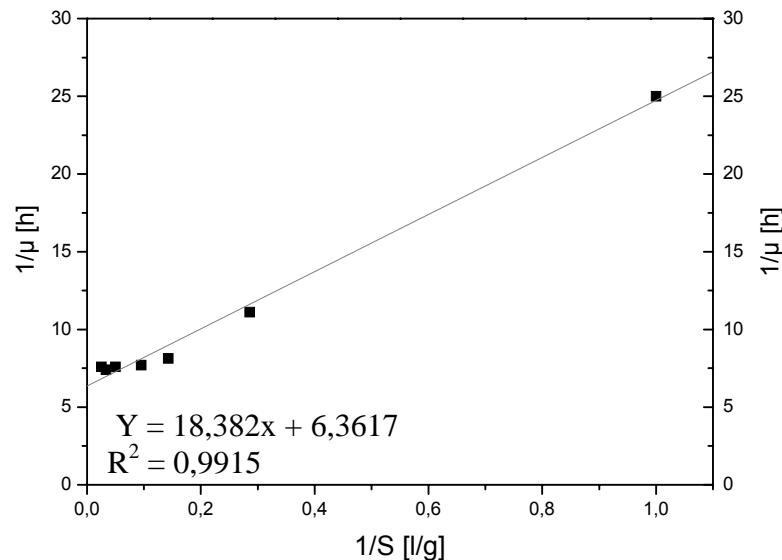
In allen Aminosäureabbauschritten wird  $NH_3/NH_4^+$  frei, das entweder ausgeschleust wird oder mit Hilfe entsprechender Enzyme wieder in Kohlenstoffverbindungen addiert wird und dem Aufbau neuer Aminosäuren dient [Stryer 1995, Lehninger 1987, Schlegel 1992].

### Variation des Komplexanteiles

Da der limitierende Faktor in Form der freien Aminosäuren aus den Komplexbestandteilen gefunden wurde, konnte ein Konzentrationsprofil dieser Größe aufgenommen werden. In diesem Fall sollte wie zuvor beim Glycerin ein Ansteigen der maximalen spezifischen Wachstumsrate mit steigender Konzentration an Komplexbestandteilen auftreten. An Hand der Abbildung 3.23 konnte ein sigmoider Verlauf der Wachstumsrate gegenüber der Substratkonzentration festgestellt werden. Dieses Ergebnis passte gut in das Monod-Modell, dem Wachstum eines Organismus mit veränderter spezifischer Wachstumsrate. In diesem Modell wird von einer einfachen Massenbilanz-Gleichung ausgegangen, wie sie für die Beschreibung chemischer Umsetzungen üblich ist. Die eingesetzten Substrate werden danach durch den Organismus in Biomasse und Produkt umgewandelt. Beim *Microbacterium spec.* kann die Produktbildung vernachlässigt werden, wodurch sich die Umsatzgleichung vereinfacht. Es entsteht eine direkte Abhängigkeit des eingesetzten Substrates zur gebildeten Biomasse. Das Wachstum kann nun ähnlich einer Enzymreaktion vom Michaelis-Menten-Typ beschrieben werden und die Halbsättigungskonstante des Substrates über verschiedene Wege bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die Variante nach Lineweaver-Burk verwendet, in welcher die

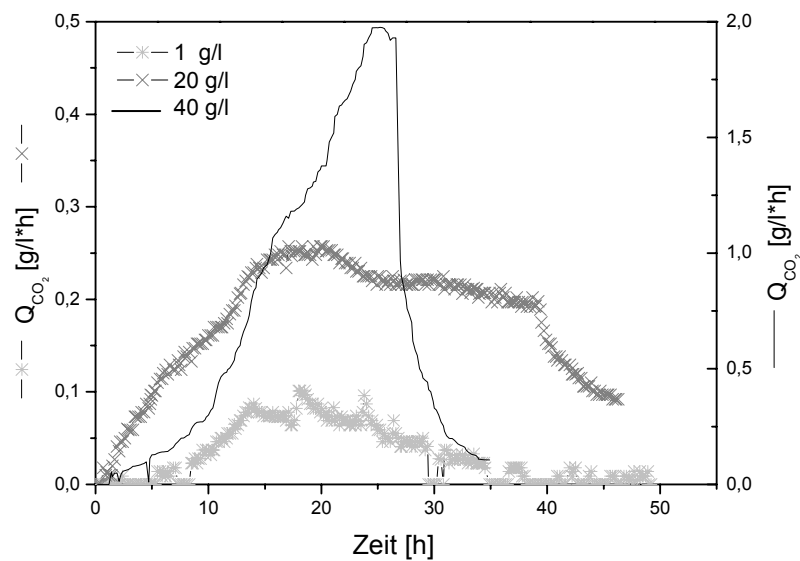


reziproken Werte der Wachstumsrate gegen die Reziproken der Substratkonzentration aufgetragen werden. Es sollte sich eine Gerade ergeben, über welche die Halbsättigungskonstante ( $K_s$ ) bestimmt wird.



**Abbildung 4.6:** Darstellung der Reziproken der spezifischen Wachstumsrate des *Microbacterium* spec. gegenüber der Substratkonzentration (Menge an Komplexanteil) nach Lineweaver-Burk Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 ohne Hefeextrakt und Bacto Pepton), C-Quelle: 20g/l Glycerin, Blattrührer

In der Abbildung 4.6 entspricht jeder Datenpunkt dem Ergebnis einer Fermentation. Die abgebildete Geradengleichung, war für die Berechnung von  $K_s$  erforderlich. An der Stelle, an der Y gleich Null ist, ergibt sich ein negativer Wert für x von -0,34608. Dieser entspricht der negativen reziproken Halbsättigungskonstanten, welche einen Wert von 2,89 g/l Komplexanteil nach dieser Darstellung erreicht.



**Abbildung 4.7:** Abgasdaten von drei Kultivierungen des *Microbacterium spec.* mit unterschiedlichem Gehalt an Komplexanteil, Kultivierungsparameter: Arbeitsvolumen 8 l, 30°C, 500 min<sup>-1</sup>, 0,4 l/l·min, pH-Wert 6,5, SM1-Medium (Material und Methoden 2.3 ohne Hefeextrakt und Bacto Pepton), C-Quelle: 20g/l Glycerin, Blattrührer

Der Verbrauch des limitierenden Substrates besitzt Auswirkungen auf die Abgasdaten. Im Gegensatz zu den Versuchen mit dem Glycerin, bei denen das Maximum der Kohlendioxidabgasrate bei allen Kultivierungen um den Wert 0,25 g/l·h schwankte, gab es deutliche Unterschiede bei der Verwendung von Hefeextrakt und Bacto Pepton (Abbildung 4.7). Das Substrat wurde in Zellmasse und Kohlendioxid umgewandelt, wodurch mit steigender Konzentration die Kohlendioxidbildungsrate zunahm.

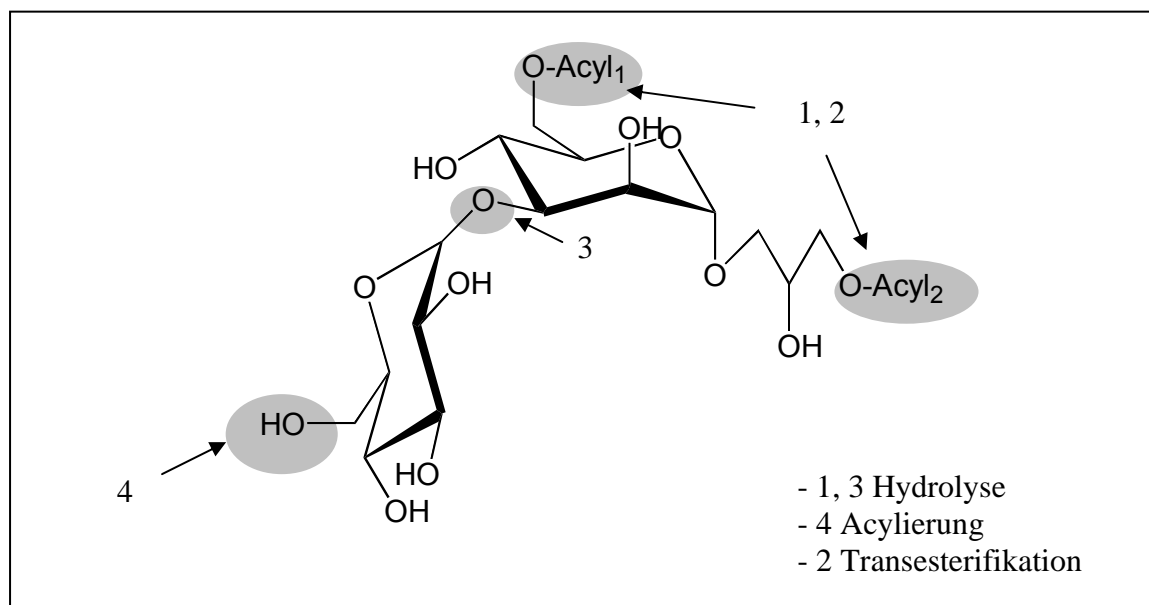
### 4.3 Enzymatische Modifikation des Glycoglycerolipids GGL.2

Aus der Literatur sind schon seit längerem zahlreiche Vertreter von Bakterien bekannt, in denen zellwandassoziierte Glycoglycerolipide vorkommen [Button et al. 1976, Lang 1970, Brundisch et al. 1968, Fischer et al. 1978, Komarat et al. 1975]. Die Ausbeuten dieser Verbindungen sind je nach Organismus unterschiedlich. Die Ausbeute beim *Corynebacterium* spec. M9b liegt im Bereich des in dieser Arbeit vorgestellten *Microbacterium* spec. [Göbbert et al. 1988]. In den letzten Jahren haben sich die Hinweise gehäuft, dass diese Verbindungen interessante bioaktive Eigenschaften besitzen [Costantino et al. 2002].

Da nicht nur die nativ vorliegende Verbindung von Interesse sein könnte, wurde versucht, die Verbindung enzymatisch zu verändern.

Vorteile solcher biokatalytischen Prozesse sind: sie sind weniger gefährlich, umweltschonender und energiesparender gegenüber konventionellen chemischen Methoden und daher eine attraktive Alternative [Bornscheuer et al. 1999]. Die Arbeit mit Enzymen in der Pharmaindustrie ist besonders vorteilhaft, weil in diesem Bereich ein großes Interesse an enantiomerenreinen und funktionalisierten Verbindungen besteht. Enzyme reagieren sehr häufig regio- und enantioselektiv, weiterhin erfolgt die Umsetzung in der Regel unter milden Bedingungen. Temperaturen von 30-60°C und ein neutraler pH-Wert werden im allgemeinen bevorzugt.

Viele Glycoglycerolipide zeigen eine vielversprechende antitumorale Wirkung, welche zukünftig zur Krebsprävention genutzt werden könnte [Matsufuji et al. 2000, Colombo et al. 1999, Murakami et al. 1995]. Es wird daher von immer größerer Bedeutung sein, die bioaktive Wirkung der Glycoglycerolipide durch gezielte enzymatische Modifikation zu steigern.



**Abbildung 4.8:** Mögliche Angriffspunkte für enzymatische Reaktionen am Glycoglycerolipid GGL.2

In der Abbildung 4.8 werden mögliche Angriffspunkte für enzymatische Umsetzungen am Glycoglycerolipid GGL.2 gezeigt. An den Punkten eins und zwei ist es möglich, die Fettsäuren abzuspalten und/oder diese durch andere zu ersetzen. Dies kann man mit Lipasen in Gegenwart von Wasser machen. Für Acylierungen (Position 4) benötigt man hydrophobe Randbedingungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene dieser Enzyme auf ihre Wirksamkeit überprüft (Tabelle 3.10). Das beste Resultat konnte mit der Lipase Novozym 435 erzielt werden.

#### 4.3.1 Enzymatische Hydrolyse des GGL.2

Aus dem Glycoglycerolipid GGL.2 wurde in einer früheren Arbeit durch alkalische Verseifung das Glycoglycerin GG2 gewonnen [Wicke 1999].

Mittels der enzymatischen Versuche mit der Novozym Lipase 435 konnte während dieser Arbeit nicht nur das GG2, sondern auch ein Intermediat GGL.2a erzeugt werden. Die besten Reaktionsbedingungen wurde bei 50 °C, in tertiärem Amylalkohol ( $H_2O < 1\%$ ) unter dem Zusatz von 0,9 Volumenprozent Wasser gefunden. Durch den Einsatz einer immobilisierten Lipase konnten auf einfachem Wege die beiden Produkte der enzymatischen Hydrolyse (GGL.2a, GG.2) erhalten und isoliert

werden. Bereits nach zwei Stunden war die Bildung des Zwischenproduktes GGL.2a zu erkennen und darauf folgend die Bildung des Hydrolysates GG.2. Nach einer Zeit von 48 Stunden war das Zwischenprodukt kaum noch nachweisbar und die Ausbeute an GG.2 betrug 90 %. Auf ähnliche Resultate bei der enzymatischen Hydrolyse mittels Lipase bei einem Diglucosyglycerolipid wurde in der Arbeit von Ramm [Ramm 2001] verwiesen. Unterschiedlich zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen fand die Umsetzung auch bei tieferen Temperaturen (40 °C) statt. Bei dieser Temperatur wurde in der vorliegenden Arbeit nur das Intermediat gebildet nicht jedoch das Hydrolysat.

Ungewöhnlich für die enzymatische Hydrolyse war, dass die Reaktion in organischen Lösemitteln in Gegenwart von nur wenig Wasser (<1%) durchführbar war. Üblich für diese Art der Umsetzung sind Medien mit größeren Wassergehalten.

Experimente mit ähnlichen Bedingungen wurden in der Literatur beschrieben [Inada 1996, Haas et al. 1993]. Dabei wurde eine immobilisierte Lipase für die Hydrolyse von Phosphatidylcholin verwendet und die besten Ausbeuten in den organischen Lösemitteln Butanol oder tertiärem Amylalkohol mit geringem Wassergehalt erzielt.

#### **4.4 Biologische Aktivitäten der Glycoglycerolipide**

Glycolipide treten als Bestandteile in Zellmembranen von Bakterien, Pilzen, Algen und höheren Organismen auf. Sie übernehmen wichtige Interaktionen, beispielsweise bei der Regulation des Zellwachstums, Adhäsion und Zelldifferenzierung.

Über interessante biologische Eigenschaften dieser Substanzen wurde in der Literatur mehrfach berichtet [Colombo et al. 2000].

Bei einem marinen Bakterium lag es nahe, auch die Interaktionen zwischen den verschiedenen Meeresbakterien zu untersuchen. Diese Überprüfung erfolgte ähnlich wie bei anderen Organismen zuerst über den Agar-Diffusionstest. Dazu wurden die Zellextrakte, die Kulturüberstandsextrakte sowie die aufgereinigten Metaboliten eingesetzt und an verschiedenen Organismen getestet (Tabelle 3.13). Als Vergleichssubstanz diente Penicillin G, welches in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde. Die stärkste Hemmung des GGL.2 trat gegenüber dem Stamm mit

der Abkürzung T4 auf, einer *Pseudonocardia* Species. In früheren Versuchen waren bei dem GGL.2 keine antimikrobiellen Eigenschaften feststellbar gewesen. Gegenüber einer kleinen Zahl mariner Isolate wurden jedoch Hemmhöfe wahrgenommen (Tabelle 3.13).

In vielen Fällen geben die Resultate der Agar-Diffusionstests erste Aussagen zur Wirksamkeit einer Substanz auf der Suche nach neuen Pharmaka. Die Krebsvorsorge bietet in diesem Zusammenhang ein breites Feld. Zum Beispiel ist das Burkitt-Lymphoma sehr selten auf der Welt, jedoch besonders stark in Zentralafrika vertreten, tritt gehäuft bei Kindern auf und ist eine der aggressivsten Formen des Krebses. In Untersuchungen dieser Krankheit bezüglich ihres Ursprungs wurde eine enge Verbindung zum Epstein-Barr Virus gefunden. Dieses ist selbst in die Gruppe der Herpes-Viren einzuordnen und tritt relativ gehäuft auf der ganzen Welt auf. Vorbeugend kann man in diesem Fall nach Substanzen suchen, welche dem Virus entgegen wirken.

Aufgrund einer Kooperation mit der Universität von Kyoto konnten auch invitro Versuche bezüglich der Anti-Tumor-Promoting-Aktivität gegen das frühe Antigen des Epstein-Barr-Virus durchgeführt werden.

Es zeigte sich, dass die Versuchsergebnisse von Wicke bestätigt werden konnten.

Die verwendeten Glycoglycerolipide unterscheiden sich lediglich in ihren Zuckerstrukturen. Beim GGL11 [Ramm et al. 2003] handelt es sich um ein Diglucosyl-, beim GGL.5 um ein Dimannosyl- und beim GGL.2 um eine Kombination ein Glucosyl-Mannosyl-Glycoglycerolipid. Es liegen jeweils zwei Acylierungsstellen vor, welche vorwiegend Fettsäuren der Form anteiso- C15:0 und C17:0 enthalten.

**Tabelle 4.4:** Beurteilung verschiedener Substanzen auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA)

Substanz	Konzentration [Molverhältnis/TPA]			
	% der positiven Kontrolle* (% Überlebensrate)			
	1000	500	100	10
GGL.2	15,2 (70)	60,7	87,7	100
GGL11*	16,5 (80)	59,7	84,1	100
GGL.5	9,1 (70)	41,5	77,6	95,7

\* Ramm [2003]

Beim Vergleich der Substanzen liegen das Diglucosyl- und das Glucosyl-Mannosyl-Glycerolipid in ihrer Wirkung dicht beieinander. Weitaus effektiver erwies sich die Verbindung mit den Zwei Mannosebausteinen. In verschiedenen Artikeln wurde referiert, dass jede freie OH-Gruppe die Anti-Tumor-Promoting-Aktivität gegen das frühe Antigen des Epstein-Barr-Virus steigert [Colombo et al. 2004, Ito et al. 2005, Ito et al. 1981].

Eine Steigerung der Effektivität durch den Einsatz einer anderen Zuckerstruktur (Mannose) scheint jedoch auch möglich.

Alle eingesetzten Substanzen wiesen Überlebensraten der Raji Zellen von 70% - 80% auf. Diese Tatsache ist von entscheidender Bedeutung, da neben der Wirksamkeit der Substanz eine gute Verträglichkeit erforderlich ist.

In der Einleitung wurde bereits auf den Lösungsansatz und die Probleme der chemischen Synthese hingewiesen. Ein nachsynthetisiertes Produkt muss nicht unbedingt die gleichen biologischen Wirkungen besitzen wie die native Struktur. Bezüglich der Anti-Tumor-Promoting-Aktivität gegen das frühe Antigen des Epstein-Barr-Virus gewannen Tokuda und Tanaka [2005] ebenfalls unterschiedliche Resultate bezüglich nativer und chemisch synthetisierter Triterpenoide. In den meisten Fällen war die Wirkung der nativen Substanz besser.

Ein weiterer Test bezüglich der Gewinnung neuer Pharmaka bei der Krebsvorsorge besteht zum Beispiel in dem „two-stage mouse skin carcinogen“-Test. Dieser wurde mit den vielversprechenden Substanzen GG.2 und GGL.2a durchgeführt. Es zeigte sich, dass beide Substanzen die Papillomabildung unterdrücken. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Tests gegenüber dem frühen Antigen des Epstein-Barr Virus

lag bei dem in vivo Experiment kein Unterschied im Wirkungsspektrum vor. Bei einem Vergleich von synthetischen Glycoglycerolipiden und den natürlich vorkommenden Analoga zeigte sich jedoch, dass bei diesem Test die synthetischen Verbindungen eine höhere Aktivität als die natürlich vorkommenden Verbindungen besaßen [Colombo 2000]. Gute Resultate bei der Verhinderung der Ausbildung von Papiloma wurden beispielsweise mit Catechinen [Nagoaka et al. 2005] und Cimigenolen [Sakurai et al. 2005] erzielt. Im Fall der Catechine konnte die Bildung der Papilloma pro Maus auf unter zwei gesenkt werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Metabolite bildeten dagegen 5,2 (GG.2) und 5,4 (GGL.2a) aus. Bei einer maximalen Anzahl von 9,3 Papilloma pro Maus (Vergleichskontrolle) wurde durch den Einsatz der Komponenten dennoch die Papillomabildung um die Hälfte reduziert.

#### **4.5 *Microbacterium spec.* Hel 12/1 und *Micrococcus luteus* Hel 12/2**

Aus den organischen Rohextrakten von Zellen und Kulturüberstand konnte jeweils ein interessanter Metabolite pro Bakterium isoliert werden, welcher sich nach der Strukturaufklärung als bereits bekannt erwies.

In beiden Fällen konnte die Wiederfindung der Metaboliten mit der gleichen Gattung in Verbindung gebracht werden (GGL.2: *Microbacterium spec.* Hel 12/1 und *Microbacterium* DSM 12583 (diese Arbeit), GGL5: *Micrococcus luteus* Hel 12/2 (diese Arbeit) und *Arthrobacter atrocyaneus* LMG [Niepel et al. 1992]). Die Metaboliten wurden weiterhin verstärkt in den Zellextrakten gefunden, was auf einen zu der Gattung spezifischen Zellbestandteil schließen lässt (Zellmembran: Glycolipide, Glycoproteine)[Madigan et.al. 2000].

Innerhalb der Medienoptimierung wurde überprüft, ob es sich bei den Bakterien um obligate oder lediglich fakultative marine Organismen handelte. Da das Wachstum am besten unter dem natürlichen Meerwassersalzgehalt verlief, ließ dies darauf schließen, dass beide Isolate ursprünglich mariner Herkunft sind und den im Meer vorherrschenden Salzgehalt für gutes Wachstum benötigen.



## 5. Zusammenfassung

### 5.1 *Microbacterium spec.* DSM 12583

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Produktoptimierung des biologisch aktiven Glycoglycerolipids GGL.2, welches von einem bakteriellen Isolat aus dem Mittelmeer (*Microbacterium spec.* DSM 12583) gebildet wird.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit Versuche unternommen, mittels enzymatischer Modifikation die Struktur des GGL.2 so zu verändern, dass die biologische Aktivität der Struktur steigt.

Im Rahmen des niedersächsischen Nordsee-Forschungsprojektes konnten in dieser Arbeit Aussagen zur Isolierung und Charakterisierung biologisch aktiver Stoffe aus marinen Nordsee-Bakterien (*Microbacterium spec.*, *Micrococcus luteus*) getroffen werden.

Im ersten Teil der Arbeit (*Microbacterium spec.* DSM12583) konnte durch den Wechsel der zusätzlichen Kohlenstoffquelle Glucose auf Glycerin eine Steigerung der Produktausbeute von 15 mg/g auf 27 mg/g Biomasse des GGL.2 im Schüttelkolben festgestellt werden.

Weitere Experimente im Schüttelkolben zur Medienoptimierung ergaben, dass die Medienkomponenten Natriumhydrogenphosphat und Ammoniumchlorid für die Kultivierungen nicht erforderlich waren und dadurch das in der Arbeit verwendete SM1-Medium um diese Bestandteile verringert werden konnte.

Für Kultivierungen im Bioreaktor musste das SM1-Medium wieder um die Bestandteile Ammoniumchlorid und Natriumhydrogenphosphat erweitert werden, da durch den Zusatz des Phosphates die spezifische Wachstumsrate von  $0,053 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,104 \text{ h}^{-1}$  und die Biomasseproduktion stieg. Mit der Optimierung des pH-Wertes auf 6,5 konnte die spezifische Wachstumsrate auf  $0,137 \text{ h}^{-1}$  gesteigert werden. Die Produktbildung erhöhte sich auf 46 mg/g Biomasse. Bei einer maximalen Biomassekonzentration von 14 g/l ergeben sich damit 522 mg/l GGL.2.

Ein Einfluss der Glycerinkonzentration auf die spezifische Wachstumsrate konnte nicht festgestellt werden. Bis zu einer Konzentration von 20 g/l trat eine lineare Zunahme der Biomasse auf. Bei weiterer Steigerung des Glycerinanteils folgte jedoch eine Abnahme der Biomassekonzentration.

Mehrere Versuche, die Biomasse- und Produktkonzentration über den volumenbezogenen Leistungseintrag zu steigern, ergaben die folgenden Fermentereinstellungen (10 l):

Arbeitsvolumen: 8l

Blattrührer

$n = 500 \text{ min}^{-1}$

$F = 0,4 \text{ l/l} \cdot \text{min}$

$T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$

pH  $6,5 \pm 0,2$

Mit diesen Einstellungen wurde eine maximale Biomassekonzentration von 14 g/l und eine maximale Produktkonzentration von 522 mg/l GGL.2 erzielt.

Durch die Variation der Komplexkonzentration (Hefeextrakt/Bacto Pepton: 1/1) wurden unterschiedliche spezifische Wachstumsraten hervorgerufen. Des Weiteren wurde bei Konzentrationen bis 3,5 g/l und ab 40 g/l die zusätzliche Kohlenstoffquelle Glycerin (20 g/l) nicht mehr vollständig verwertet.

Um die Biomassekonzentration über einen längeren Zeitraum zu halten und damit den ersten Schritt in Richtung der kontinuierlichen Kulturführung zu gehen, wurde dementsprechend konzentrierte Komplexlösung über einen Zeitraum von 64 Stunden dosiert. Die Biomassekonzentration von 12,5 g/l konnte über diesen Zeitraum gehalten werden. Die Produktkonzentration wies über diesen Zeitraum leichte Schwankungen auf und bewegte sich im Bereich von 500 mg/l GGL.2 (Abb.: 3.24).

Für die rechnergestützte Prozessoptimierung wurde ein Modell entwickelt, mit dem die Kultivierungsparameter Biomasse- und Produktbildung, sowie die Substratkonzentration (Komplexkonzentration) in Batch-Fermentationen unter bestimmten Kultivierungsbedingungen im Voraus berechenbar sind.

Nach der mikrobiellen Produktion des GGL.2 erfolgte die Isolierung der Substanz aus dem Zellextrakt, um sie anzureichern. Die guten biologischen Eigenschaften des GGL.2 sollten durch enzymatische Modifikationen gesteigert werden.

Neben der Grundstruktur (GG.2 Zuckergerüst), die mittels enzymatischer Hydrolyse gewonnen wurde, konnte ein Zwischenprodukt (GGL.2a) angereichert werden. Ausgehend vom nativen Grundgerüst (GGL.2), an das zwei Fettsäuren gebunden sind, konnte eine Zunahme der biologischen Aktivität (Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA)) durch die schrittweise Abspaltung der Fettsäuren festgestellt werden. Die Überlebensrate der bei diesem Test verwendeten Raji-Zellen blieb dabei unverändert gut (70%).

## **5.2 *Microbacterium spec.* (Hel12/1) und *Micrococcus luteus* (Hel12/2)**

Bei der Arbeit mit den Isolaten der Nordsee erfolgte als erstes eine Stammbestimmung mittels 16S-rRNA-Sequenzierung. Die Stämme konnten der Gattung *Microbacterium* (Hel12/1) bzw. der Art *Micrococcus luteus* (Hel12/2) zugeordnet werden.

Von beiden Stämmen wurden Metabolite gebildet, welche großes Interesse weckten. Nach der Anreicherung und Isolierung der Substanzen folgte die Strukturaufklärung. Es zeigte sich, dass beide Strukturen schon bekannt waren.

*Microbacterium spec.* (Hel12/1) produzierte ähnlich dem Stamm aus dem Mittelmeer (*Microbacterium spec.* DSM 12583) das Glycoglycerolipid GGL.2.

*Micrococcus luteus* (Hel12/2) reichte ebenfalls ein Glycoglycerolipid an. Es handelte sich dabei um eine Dimannosylverbindung von der erstmals 1997 [Niepel et al. 1997] berichtet wurde.

Bei den Stämmen erfolgte eine Medienoptimierung ausgehend vom Komplexmedium Marine Broth. In beiden Fällen wurden die Glycoglycerolipide auch ohne den Zusatz von Glucose gebildet. Durch das Zusetzen von Glucose (20 g/l) konnte jedoch die Ausbeute beim *Micrococcus luteus* (Hel12/2) von 1,66 mg/g (ohne Glucose) auf

---

6,1 mg/g (mit Glucose) Biomasse gesteigert werden. *Microbacterium* spec. zeigte eine fast konstante Produktbildung mit 22,4 mg/g (ohne Glucose) und 22,8 mg/g (mit Glucose) Biomasse.

Nach dem Wechsel auf definierte Medien folgten Bioreaktorkultivierungen, in denen maximale Produktkonzentrationen von 215 mg/l beim *Microbacterium* spec. und 182,6 mg/l beim *Micrococcus luteus* erreicht wurden.

## 6. Symbolverzeichnis

### Formelzeichen

BTM $\equiv$ X	[g/l]	Biotrockenmasse
D	[h <sup>-1</sup> ]	Durchflussrate
D <sub>krit</sub>	[h <sup>-1</sup> ]	kritische Durchflussrate
F	[l/l·min]	volumenbezogene Begasungsrate
K <sub>s</sub>	[mg/l]	Substratsättigungskonstante
MG	[g/mol]	Molekulargewicht
p	[bar]	Druck
P	[W]	Leistung
P	[mg/l]	Konzentration des Produktes
P <sub>ges</sub>	[W]	Gesamtleistung
P <sub>0</sub>	[W]	Null-Leistung
pO <sub>2</sub>	[%]	Sauerstoffpartialdruck
P <sub>V</sub>	[mg/l h <sup>-1</sup> ]	Produktivität
q <sub>CO2</sub>	[g/g h <sup>-1</sup> ]	spezifische Kohlendioxidbildungsrate
q <sub>O2</sub>	[g/g h <sup>-1</sup> ]	spezifische Sauerstoffaufnahme
Q <sub>CO2</sub>	[g/l h <sup>-1</sup> ]	Kohlendioxidbildungsrate
Q <sub>O2</sub>	[g/l h <sup>-1</sup> ]	Sauerstoffaufnahme
R	[bar·l/mol·K]	allgemeine Gaskonstante
RQ	[1]	Respirationsquotient
S	[g/l]	Konzentration des Substrates
t	[h]	Zeit
T	[°C]	Temperatur
T <sub>N</sub>	[°C]	Temperatur unter Normbedingungen
U <sub>pm</sub>	[min <sup>-1</sup> ]	Umdrehungen pro Minute
$\dot{V}$	[l/h]	Volumenstrom
V <sub>F</sub>	[l]	Flüssigkeitsvolumen
V <sub>R</sub>	[l]	Reaktorvolumen
V <sup>*</sup>	[l/h]	Volumenstrom
V <sup>*</sup> <sub>N</sub>	[l/h]	Volumenstrom der Zuluft unter Normbedingungen

---

$X$	[g/l]	Biotrockenmasse
$X_i^A$	[1]	Molenbruch der Komponente i am Gasaustritt
$X_i^E$	[1]	Molenbruch der Komponente i am Gaseintritt
$Y_{P/S}$	[1]	Gesamtausbeutekoeffizient [g] Produkt aus [g] Substrat S
$Y_{P/X}$	[1]	Ausbeutekoeffizient [g] Produkt zu [g] Biomasse
$Y_{X/S}$	[1]	Ertragskoeffizient [g] Biomasse aus [g] Substrat S
$\mu$	[h <sup>-1</sup> ]	spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\max}$	[h <sup>-1</sup> ]	maximale spezifische Wachstumsrate

### Abkürzungen

A	Koeffizient [1]
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adosintriphosphat
BR	Bioreaktor
C-Quellen	Kohlenstoffquelle
CSTR	continuous-flow-stirred-tank reactor
DC	Dünnschichtchromatographie
DMBA	Dimethylbenzanthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
EBV-EA	Epstein-Barr-Virus-Early-Antigen
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
HPLC	High-pressure-liquid -chromatography
KSW	Künstliches Seewasser
MB	Komplexmedium Marine Broth
MeOH	Methanol
MPLC	Middle-pressure-liquid -chromatography
MS	Massenspektroskopie
MTBE	tert.-Buthylmethylether
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NMR	Kernresonanzspektroskopie

---

N-Quelle	Stickstoffquelle
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-Quelle	Phosphatquelle
Rf-Wert	„Ratio of fronts“-Wert
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
SK	Schüttelkolben
SM	Synthetisches Meerwasser
spec.	Spezies
THF	Tetrahydrofuran
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Vol. %	Volumenprozent
l/l·min	Volumen pro Volumen und Minute
z	Koeffizient

### Dimensionslose Kennzahlen

$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 d^5}$$

Newton-Zahl

$$Q = \frac{v}{n d^3}$$

Begasungskennzahl

$$Fr = \frac{v^2}{g d}$$

Froude-Zahl

$$Re = \frac{n \cdot d^2 \cdot \rho}{\eta}$$

Reynoldszahl

## 7. Anhang

### 7.1 16S rRNA-Analyse des Nordseeisolates Hel12/1

Hel-12/1 forward sequence 397: (99,7 % *Microbacterium* spec.)

TGCAGTCGAACGGTGAAGCCCCGCTTGCGGGGTGGATCAGTGGCGAACGGGT  
GAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGC  
GTCTAATACTGGATACGAGACGTGATCGCATGGTCAACGTTTGGAAAGATTTTC  
GGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC  
AAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG  
GCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT  
AAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCA  
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATC  
CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAA  
TCTGGGGGGCTCAACCCCCAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGG  
TAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCANATATCAGGAGG  
AACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAAGTACNCTGAGNANCGAA  
AGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAAATACCCTGGTAGTCCNCCCGTAAACGTTG  
GAACTANTTGGGGGGTTCNTTTCCCGGATCCGTGACNCACCTACNCATNANTTCC  
CCCCTGGGANTACGNCCAGGCTAAACTCAAGAATNACGGGACCCCCANCGCG  
AACTGCGATATTCAGCNCNNAAAAC

Hel-12/1 reverse sequence 398:

TTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTAGGCCACCGGCTTCAGGTGTTACCGA  
CTTTCATGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCA  
GCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGAGGTCGAGTTGCAG  
ACCTCAATCCGAACCTGGGACCGGCTTTTTGGGATTGCTCCACCTCACGGTATT  
GCAGCCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGG  
CATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTATCC  
CATGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCT  
GTTTACGAGTGTCCAAGAGTTGACCATTTCTGGCCCGTTCTCGTATATGTCAAG  
CCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTG  
TGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGG  
CGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCACA  
ACTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGTATCTAAGCCTGTTTGCT  
CCCCACCCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCCANANATCTGCCTTCNCCA  
TCGGTGTTCTCCTCNTGAATCTGCCATTCCACNGNTACNCAGGAATTCANTCTCC  
CTACGCNTNTATCTGCCGTACCANTGNAGGCNNGGNTGANCCCCNANTTCAGN  
AAANCNAAANCCCTAAANTT



## 7.2 16S rRNA-Analyse des Nordseeisolates Hel12/2

Hel-12/2 forward sequence 399: (*Arthrobacter* 99% *Micrococcus luteus*)

```
TTGCTGGGTGGACTNTGTGGCGAACGGGTGAGTACACGTGAGTAACCTGCCCT
TAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCCTA
CCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTAT
CAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTG
AGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCC
GCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGC
GAAAGTGACNGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCCTTAACCCCCGGATC
TGCGGTGGGTACGGNCAGACTAAGAGTGCANTAGGGGANACTGGAAATTCCCT
GTTTGTNANCGGTGGAATGCGCCAGATNTCNNGAAGGAACNCCNATGGGCGAA
AGCCGGGTNTCTGGGGCTGTNACTGACCCCTTNAGGACCNAAGCTTGGGGA
GCNGAACNGGATTANANACCCNNGGTGNTCCATNCCGAAAACCTTGGNCACTAG
NTNNGGGGACCATTNCCCGGTTTTCCCCCCCCNACTAACGCAATNAATGCCCCC
CCTGGNGAGTNCGGCCNCNGGTTAAATNNAANANTTAGCGGGNCCCCCNCNNN
GGGANCANTGCGNATTNTTNNNCC
```

Hel-12/2 reverse sequence 400:

```
GNTAAACTCTATTTAACGGCTCCCCCACAAGGGTTAGGCCACCGGCTTCGGGT
GTTACCAACTTTCTGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT
CACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCG
AGTTGCAGACCCCAATCCGAAGTGAAGACCGGCTTTTTGGGATTAGCTCCACCTC
ACAGTATCGCAACCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACA
TAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCTCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGC
AGTCTCCCATGAGTCCCCACCATACGTGCTGGCAACATGGAACGAGGGTTGC
GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT
GCACCACCTGTGAACCCGCCCAAGGGGAAACCGTATCTCTACGGCGATCGA
GAACATGTCAAGCCTTGGTAAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATG
CTCCGCCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCC
GTAATCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCNGCGCGGAAAACCGTGG
AATGGTCCCCACACCTAGTGCCNACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTA
NTCCTGGTTCTGCTCCCAATGCTTTTCGCTCCTCANCGGTCAGTTTACAGNCCAA
AAACCTGCCTTCGCCATNGGTGTTCTCCTGAAATTNTGCCNATTCCANCCGTN
ANCCAGGAATTCCAGTCTCCCNATTTGGACTTTATTTTGNCCGTACCCNCCGAA
ATCCGGGGTTAANCCCCGNNATTTAGAAAAAANCNGNAAAACGCCNAAANCTT
TTAACCCA
```

### 7.3 Daten zur Strukturaufklärung für GGL.2, GGL.2a und GG2

**Tabelle 7.1:**  $^1\text{H}$  NMR-Daten für den Metaboliten GGL.2

	GGL.2*			GGL.2		
	Chemische Verschiebung	Kopplungs- konstante		Chemische Verschiebung	Kopplungs- konstante	
Mannose						
H-1	4,77	(1-2)	1,3	4,77	(1-2)	1,7
H-2	4,12			4,1		
H-3	3,85-3,82			3,81		
H-4	3,85-3,82			3,8		
H-5	3,79			3,79		
H-6A	4,42	(6A-5)	1,6	4,41	(5-6A)	1,9
H-6B	4,28	(6B-5)	6,2	4,28	(5-6B)	5,8
		(6A-6B)	11,8		(6A-6B)	11,9
Glucose						
H-1	5,12	(1-2)	3,9	5,11	(1-2)	4,0
H-2	3,46	(2-3)	10,5	3,45	(2-3)	9,4
H-3	3,7	(3-4)	9,3	3,69	(3-4)	9,0
H-4	3,24	(4-5)	9,4	3,23	(4-5)	9,8
H-5	3,86			3,86		
H-6A	3,89	(6A-5)	2,2	3,9-3,77		
H-6B	3,63	(6B-5)	7,0	3,69		
		(6A-6B)	11,6		(6A-6B)	11,8
Glycerin						
H-1A	3,76	(1A-2)	5,7	3,75	(1A-2)	4,0
H-1B	3,44	(1B-2)	4,8	3,45	(1B-2)	6,2
		(1A-1B)	11,5		(1A-1B)	10,5
H-2	3,98			3,98		
H-3A	4,1	(3A-2)	3,9			
H-3B	4,14	(3B-2)	3,9	4,12		
		(3A-3B)	10,3			

\*Daten (Wicke 1999)

**Tabelle 7.2:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Fettsäureester des Metaboliten GGL.2

GGL.2*			GGL.2	
	Chemische Verschiebung	Kopplungs-konstante	Chemische Verschiebung	Kopplungs-konstante
Fettsäure ( $\text{CO}$ , $^2\text{CH}_2$ , $^3\text{CH}_2$ , $^{\text{rest}}\text{CH}_2\ldots$ )				
$^2\text{CH}_2$	2,35		2,35	(2-3) 7,5
$^3\text{CH}_2$	1,62		1,63	(3-4) ~7
$^{\text{rest}}\text{CH}_2$	1,35-1,23		1,35-1,25	
iso-Konfiguration [ $^{\text{a}}\text{CH}_3$ ] <sub>2</sub> , $^{\text{b}}\text{CH}$ , $^{\text{c}}\text{CH}_2\ldots$ ]				
a	0,86	(a-b) 6,8	0,86	(a-b) 6,6
b	1,52		1,52	(b-c) 6,6
c	1,16		~1,15	
anteiso-Konfiguration [ $^{\text{a}'}\text{CH}_3$ , $^{\text{b}'}\text{CH}_2$ , $^{\text{c}'}\text{CH}$ ( $^{\text{c}''}\text{CH}_3$ ), $^{\text{d}'}\text{CH}_2\ldots$ ]				
a', c''	0,86		0,85, 0,84	
b', c', d'	1,12, 1,26		1,1, 1,35-1,25	
$^{13}\text{C}$ -NMR der Methylreste anteiso				
a	11,5		11,5	
c	19,4		19,3	
$^{13}\text{C}$ -NMR der Methylreste iso				
a'	22,8		22,7	

\* Daten (Wicke 1999)

**Tabelle 7.3:** Massenspektrometrische Analyse der Lipidzusammensetzung mittels Negativ-Ionen ESI MS des Metaboliten GGL.2

Komponente	Negativ-Ion [M-H] <sup>-</sup> (%)	Fettsäure (R1/R2)	Anteil der Komponente
GGL.2*	863	C15:C15	21
	877	C15:C16	27
	891	C15:C17	44
GGL.2	863,5	C15:C15	9
	877,5	C15:C16	40
	891,6	C15:C17	51

\* Daten (Wicke 1999)

Prozentualer Anteil von anteiso zu iso: 72 % zu 28 %

**Tabelle 7.4:**  $H^1$  NMR-Daten für die Metabolite GGL.2a und GG2

	GGL.2a			GG.2		
	Chemische Verschiebung	Kopplungs- konstante		Chemische Verschiebung	Kopplungs- konstante	
Mannose						
H-1	4,77	(1-2)	1,7	4,81	(1-2)	1,9
H-2	4,12			4,15	(2-3)	2,7
H-3	3,83			3,87		
H-4	3,93-3,6			3,93-3,75		
H-5	3,79			3,93-3,75		
H-6A	4,41			3,93-3,75		
H-6B	4,28	(6B-5)	5,7	3,93-3,75		
		(6A-6B)	11,8			
Glucose						
H-1	5,13	(1-2)	3,9	5,15	(1-2)	4,0
H-2	3,45	(2-3)	9,6	3,44	(2-3)	9,8
H-3	3,69	(3-4)	9	3,9	(3-4)	9,0
H-4	3,24	(4-5)	10	3,28	(4-5)	10
H-5	3,86			3,92	(5-6A)	2,2
H-6A	3,93-3,6			3,93-3,75		
H-6B	3,93-3,6			3,69		
Glycerin						
H-1A	3,75			3,82		
H-1B	3,44	(1B-2)	6,4	3,48	(1B-2)	7,7
		(1A-1B)	10,7		(1A-1B)	11,5
H-2	3,81			3,82		
H-3A	3,93-3,6			3,62	(2-3B)	5,6
H-3B				3,56	(3A-3B)	11,3

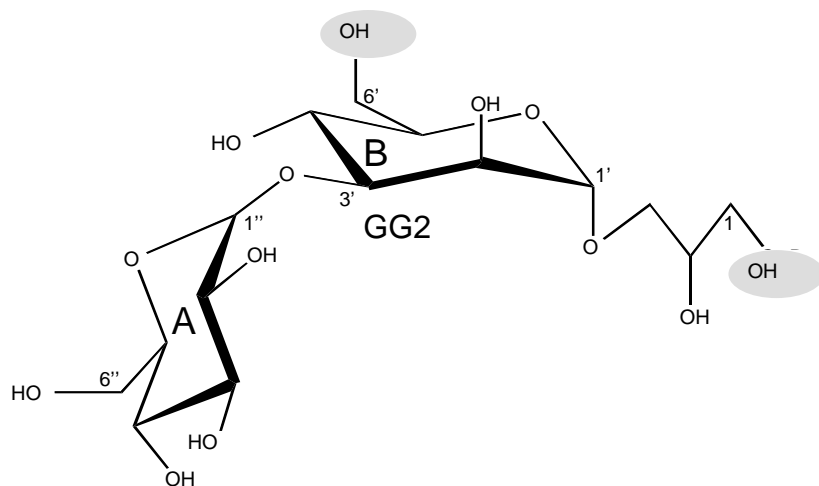
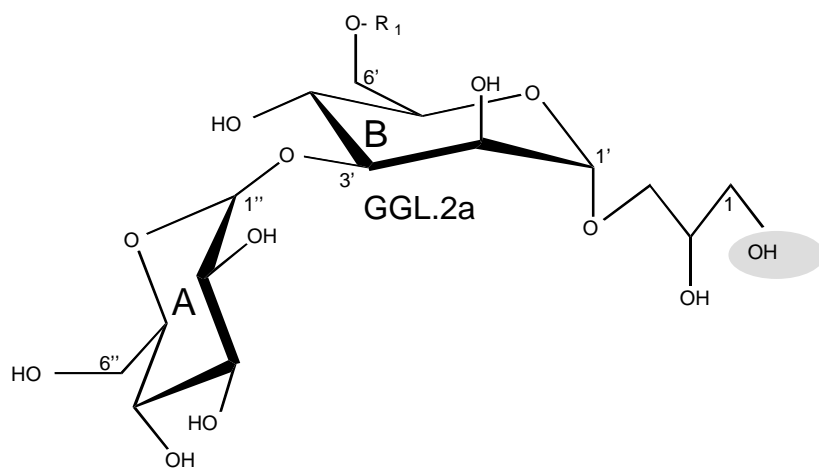
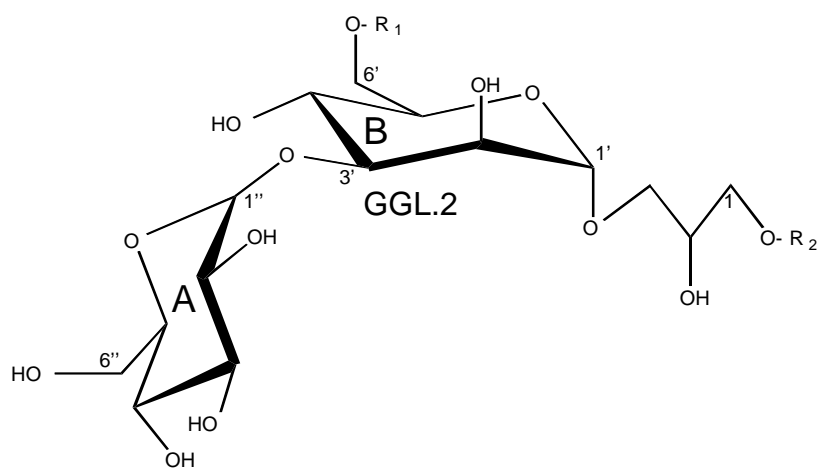
**Tabelle 7.5:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Fettsäureester für die Metabolite GGL.2a und GG2

	GGL.2a		GG2	
	Chemische Verschiebung	Kopplungs-konstante	Chemische Verschiebung	Kopplungs-konstante
Fettsäure ( $\text{CO}$ , $^2\text{CH}_2$ , $^3\text{CH}_2$ , $^{\text{rest}}\text{CH}_2\ldots$ )				
$^2\text{CH}_2$	2,24	(2-3) 7,5		
$^3\text{CH}_2$	1,62			
$^{\text{rest}}\text{CH}_2$	1,35-1,25			
iso-configuration [ $^{\text{a}}\text{CH}_3$ , $^{\text{b}}\text{CH}$ , $^{\text{c}}\text{CH}_2\ldots$ ]				
a	0,86	(a-b) 6,5		
b	1,52	(b-c) 6,6		
c	~1,15			
anteiso-configuration [ $^{\text{a}'}\text{CH}_3$ , $^{\text{b}'}\text{CH}_2$ , $^{\text{c}'}\text{CH}$ ( $^{\text{c}''}\text{CH}_3$ ), $^{\text{d}'}\text{CH}_2\ldots$ ]				
a', c''	0,85, 0,84			
b', c', d'	1,1, 1,35-1,25			
$^{13}\text{C}$ -NMR der Methylreste anteiso				
a	11,5			
c	19,3			
$^{13}\text{C}$ -NMR der Methylreste iso				
a'	22,7			

**Tabelle 7.6:** Massenspektrometrische Analyse der Lipidzusammensetzung mittels Negativ-Ionen ESI MS für die Metabolite GGL.2a und GG2

Komponente	Negativ-Ion [M-H] <sup>-</sup> (%)	Fettsäure R1	Anteil der Komponente
GGL.2a	639	C15	92
	667,4	C17	8
GG2	415,1		

## Darstellung der Strukturformeln von GGL.2, GGL.2a, GG2



## 7.4 Daten aus dem Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis Test

**Tabelle 7.7:** Darstellung der in vivo Tests bezüglich der Papillomabildung bei Mäusen

Zeit [Wochen]	Positiv Kontrolle		Wirkstoff	
	DMBA (390 nmol) + TPA (1,7 nmol, 1 µg)		GG.2 (85 nmol)	
	Papilloma [%]	Papilloma/Maus	Papilloma [%]	Papilloma/Maus
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	20,0	1,0	0	0
7	33,3	2,0	0	0
8	60,0	3,3	13,3	0,7
9	90,0	4,7	20,0	1,4
10	100	5,4	26,6	1,6
11	100	5,9	33,3	1,9
12	100	6,3	46,6	2,1
13	100	6,8	46,6	2,5
14	100	7,4	53,3	2,7
15	100	7,8	60,0	3,1
16	100	8,3	73,3	3,4
17	100	8,5	80,0	3,7
18	100	8,7	80,0	4,3
19	100	9,0	86,6	4,7
20	100	9,3	93,3	5,2

**Tabelle 7.8:** Darstellung der in vivo Tests bezüglich der Papillomabildung bei Mäusen

Zeit [Wochen]	Positiv Kontrolle DMBA (390 nmol) + TPA (1,7 nmol, 1 µg)		Wirkstoff GGL.2a (85 nmol)	
	Papilloma [%]	Papilloma/Maus	Papilloma [%]	Papilloma/Maus
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	20,0	1,0	0	0
7	33,3	2,0	0	0
8	60,0	3,3	13,3	0,5
9	90,0	4,7	20,0	1,3
10	100	5,4	26,6	1,7
11	100	5,9	33,3	2,1
12	100	6,3	40,0	2,4
13	100	6,8	46,6	2,9
14	100	7,4	53,3	3,1
15	100	7,8	60,0	3,3
16	100	8,3	66,6	3,7
17	100	8,5	73,3	4,0
18	100	8,7	80,0	4,3
19	100	9,0	80,0	4,6
20	100	9,3	93,3	5,4



## 7.5 Ergebnisse aus den Schüttelkolbenkultivierungen von Hel 12/1 Microbacterium spec. und Hel 12/2

**Tabelle 7.9:** Substratverwertung bei BBL®-Testsystemen vom Nordseeisolat *Microbacterium spec.* (Hel 12/1)

Substrat	Verwertung
Glucose	+
Arginin	-
Lysin	-
Lactose	+
Sacharose	+
Xylose	+
Maltose	+
Mannitol	+
Phenylalanin	-
Harnstoff	+
Citrate	+
Ornithine	-
Indole	-
Adonitol	+
Lactose	+
Arabinose	-
Sorbitol	-

(+ = verwertbar, - = nicht verwertbar, +- = keine eindeutige Reaktion)

**Tabelle 7.10:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des Komplexmediums Marine Broth mit und ohne Glucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Medium	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
MB	3,37	75,66	22,45	0
MB+G	4,43	101,00	22,80	12,45

**Tabelle 7.11:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung der definierten Medien KSW und SM1 (Material und Methoden 2.3, SM1 ohne Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit und ohne Glucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Medium	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
KSW P/H	2,80	64,12	22,90	0
KSW P/H + G	4,80	113,18	23,58	9,70
SM1 P/H	2,90	66,30	22,90	0
SM1 P/H + G	5,00	117,90	23,57	9,80

**Tabelle 7.12:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des definierten Mediums SM1 (Material und Methoden 2.3 ohne Bacto Pepton, Hefeextrakt, Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit Glucose und steigendem Anteil an Bacto Pepton, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Bacto Pepton [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
1	0,67	8,71	13,00	18,85
2	1,21	17,42	14,40	17,25
3,5	1,54	24,63	16,00	17,00
5	1,61	23,99	14,90	15,85
10	2,58	37,54	14,55	12,95

**Tabelle 7.13:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des definierten Mediums SM1 (Material und Methoden 2.3 ohne Bacto Pepton, Hefeextrakt, Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit Glucose und steigendem Anteil an Hefeextrakt, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Hefeextrakt [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
1	2,06	41,46	20,13	15,20
2	3,75	85,78	22,87	11,75
3,5	4,56	104,88	23,00	8,40
5	7,69	172,24	22,40	4,20
10	10,7	228,32	21,34	0
15	9,92	209,51	21,12	0
20	11,79	244,07	20,70	0

**Tabelle 7.14:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des definierten Mediums SM1 (Material und Methoden 2.3 ohne Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) bei unterschiedlichen Temperaturen und zusätzlichem Glucosezusatz, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Temperatur	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
9 °C	1,23	23,26	18,96	18,20
12° C	2,46	49,54	20,10	18,10
17° C	3,01	64,95	21,56	15,30
20 °C	4,58	127,10	27,75	11,60
27 °C	5,10	180,30	35,35	9,60
30 °C	5,00	117,90	23,57	9,80
33° C	3,23	65,99	20,43	13,00
35 °C	1,07	mini	0	18,50

**Tabelle 7.15:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des definierten Mediums SM1 (Material und Methoden 2.3, ohne Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit steigender Glucosekonzentration, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 27°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5

Glucose [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
0	2,89	68,94	23,90	0
10	3,36	118,01	35,12	5,20
20	5,10	180,30	35,35	9,60
25	4,95	174,50	35,25	15,80
30	4,95	174,07	35,17	19,30

**Tabelle 7.16:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des definierten Mediums SM1 (Material und Methoden 2.3 ohne Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit variierender zusätzlicher Stickstoffquelle und Glucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 27°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Probe	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
NH <sub>4</sub> Cl	4,69	100,12	21,35	10,30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,75	4,00	5,33	18,80
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3,47	78,93	22,75	9,40
NaNO <sub>3</sub>	5,30	189,96	35,84	7,40

**Tabelle 7.17:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des definierten Mediums SM1 (Material und Methoden 2.3 ohne Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit steigender Konzentration an zusätzlichem Natriumnitrat und zusätzlicher Glucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 27°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

NaNO <sub>3</sub> [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
ohne	5,10	179,84	35,26	9,60
1	5,5	194,42	35,35	9,30
1,5	6,15	218,32	35,50	8,50
2,5	6,28	225,14	35,85	8,00
5	5,76	203,90	35,40	8,25
7,9	5,67	182,57	32,20	8,15
10	4,85	136,58	28,16	15,80

**Tabelle 7.18:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des definierten Mediums SM1 (Material und Methoden 2.3 ohne Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit variierendem Medienanteil (Salzgehalt) und zusätzlicher Glucose sowie 2,5 g/l Natriumnitrat, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 27°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Probe	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
1,25	4,53	96,48	21,30	10,80
1	6,28	225,14	35,85	8,00
0,75	3,12	89,13	28,57	10,20
0,5	2,68	68,87	25,70	8,80

**Tabelle 7.19:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Microbacterium spec.* unter Verwendung des definierten Mediums SM1 (Material und Methoden 2.3 ohne Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit steigender Konzentration an Natriumhydrogenphosphat und zusätzlicher Glucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 27°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
0	6,28	225,14	35,85	8
0,3	6,28	226,14	36,01	8,3
0,6	6,30	229,45	36,42	7,6
0,89	6,50	239,78	36,89	7,1
1	5,90	216,65	36,72	8,55
1,3	5,50	201,00	36,55	8,55

## 7.6 Ergebnisse aus den Schüttelkolbenkultivierungen von *Micrococcus luteus* Hel 12/2

**Tabelle 7.20:** Substratverwertung bei BBL®-Testsystemen vom Nordseeisolat *Micrococcus luteus* (Hel12/2)

Substrat	Verwertung
Glucose	+
Arginine	-
Lysine	-
Lactose	-
Sacharose	+
Xylose	+
Maltose	+
Mannitol	+
Phenylalanine	+-
Harnstoff	+
Citrate	+-
Ornithine	-
Indole	-
Adonitol	+
Lactose	+
Arabinose	+
Sorbitol	+

(+ = verwertbar, - = nicht verwertbar, +- = keine eindeutige Reaktion)

**Tabelle 7.21:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des Komplexmediums Marine Broth mit und ohne Glucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Medium	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
MB	2,86	4,75	1,66	0
MB/Glucose	5,66	34,70	6,13	9,50

**Tabelle 7.22:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung der definierten Medien KSW und SM1 (Material und Methoden 2.3, SM1 ohne Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumchlorid) mit und ohne Glucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Medium	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
KSW P/H Glucose	6,23	49,94	8,02	13,20
KSW P/H	3,86	23,21	7,56	0
SM1 P/H Glucose	5,19	36,11	6,96	15,35
SM1 P/H	2,90	19,72	6,82	0

**Tabelle 7.23:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des definierten Mediums KSW (Material und Methoden 2.3 ohne Bacto Pepton und Hefeextrakt) mit Glucose und steigendem Anteil an Bacto Pepton, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Bacto Pepton [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
1,0	1,36	6,89	5,07	13,90
3,0	3,03	16,11	5,32	11,60
3,5	3,21	19,35	6,03	11,60
5,0	4,28	23,00	5,37	11,60
10,0	7,27	33,30	4,59	10,60
20,0	13,24	54,81	4,14	6,80

**Tabelle 7.24:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des definierten Mediums KSW (Material und Methoden 2.3 ohne Bacto Pepton und Hefeextrakt) mit Glucose und steigendem Anteil an Hefeextrakt, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Hefeextrakt [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
1,0	1,98	9,66	4,88	12,70
3,0	3,07	17,28	5,63	12,40
3,5	3,65	20,78	5,69	12,10
5,0	4,56	22,13	4,85	10,90
10,0	6,87	32,80	4,77	10,60
15,0	9,81	41,17	4,20	8,90

**Tabelle 7.25:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des definierten Mediums KSW (Material und Methoden 2.3 ohne Bacto Pepton und Hefeextrakt) bei unterschiedlichen Temperaturen und zusätzlichem Glucosezusatz, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Glucose

Temperatur	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
20° C	2,96	21,21	7,16	16,30
27° C	4,16	31,05	7,46	15,30
30° C	<b>6,23</b>	49,93	8,01	13,20
35° C	5,52	32,45	5,88	15,00

**Tabelle 7.26:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des definierten Mediums KSW (Material und Methoden 2.3) mit steigender Glucosekonzentration, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5

Glucose [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
0	3,86	23,22	7,57	0
10	5,49	43,64	7,95	3,90
20	6,23	49,94	8,01	13,20
25	5,81	44,76	7,70	16,30
30	5,76	44,28	7,69	20,90
40	5,74	41,14	7,17	29,60

**Tabelle 7.27:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des definierten Mediums KSW (Material und Methoden 2.3) mit variierender zusätzlicher Stickstoffquelle und Guucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Guucose

Probe	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
NH <sub>4</sub> Cl	6,02	38,81	6,45	14,15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,00	9,06	3,02	18,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5,67	47,92	8,45	12,65
NaNO <sub>3</sub>	7,50	75,72	10,04	13,20

**Tabelle 7.28:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des definierten Mediums KSW (Material und Methoden 2.3) mit steigender Konzentration an zusätzlichem Natriumnitrat und zusätzlicher Guucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Guucose

NaNO <sub>3</sub> [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
ohne	<b>6,23</b>	49,93	<b>8,01</b>	<b>13,20</b>
1,5	6,50	67,31	10,35	7,10
2,5	7,28	76,98	10,57	8,00
5,0	8,02	95,79	11,94	5,00
8,0	7,67	77,34	10,08	8,15
10,0	5,80	58,13	10,02	12,10

**Tabelle 7.29:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des definierten Mediums KSW (Material und Methoden 2.3) mit variierendem Medienanteil (Salzgehalt) und zusätzlicher Guucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Guucose

Probe	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
1,25	5,28	44,88	8,50	15,85
1	8,02	95,77	11,94	5,00
0,75	5,07	36,50	7,20	15,10
0,5	4,52	27,12	6,00	15,30

**Tabelle 7.30:** Vergleich der Biomasse- und Produktausbeute des *Micrococcus luteus* unter Verwendung des definierten Mediums KSW (Material und Methoden 2.3) mit variierendem Anteil an Natriumhydrogenphosphat und zusätzlicher Guucose, Arbeitsbedingungen: 2l Schüttelkolben mit Schikanen, 30°C, 100 min<sup>-1</sup>, Anfangs-pH-Wert 7,5, zusätzliche C-Quelle 20 g/l Guucose

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O [g/l]	BTM [g/l]	Produkt [mg/l]	Ausbeute [mg/g]	Glucoserest [g/l]
0	8,02	95,79	11,94	5,00
0,3	8,00	89,46	11,18	8,30
0,6	7,94	88,23	11,11	8,60
0,89	8,01	88,15	11,00	8,10
1	6,89	70,60	10,25	8,55

## 7.7 Daten zur Strukturaufklärung für GGL5

**Tabelle 7.31:**  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR-Daten für den Metaboliten GGL.5

	$^1\text{H}$ Chemische Verschiebung	Kopplungs- konstante, J(HH)	$^{13}\text{C}$ Chemische Verschiebung
Mannose''			
H-1	5,09	(1-2) 1,6	102,3 $^1\text{J}(\text{CH})$ 169,4
H-2	3,97	(2-3) 3,3	70,8a
H-3	3,79	(3-4) 9,5	73,6
H-4	3,59	(4-5) 9,5	68,6a
H-5	3,75		71,6
H-6A	3,87	(6A-5) 2,1	62,3b
H-6B	3,71	(6B-5) 6,5	
		(6A-6B) 11,5	
Mannose'			
H-1	4,77	(1-2) 1,7	101,3 $^1\text{J}(\text{CH})$ 170,8
H-2	4,05	(2-3) 3,2	70,0a
H-3	3,84	(3-4) 9,5	79,1
H-4	3,77	(4-5) ---	66,7a
H-5	3,76		71,4
H-6A	4,39	(6A-5) klein	64,2b
H-6B	4,29	(6B-5) 5,8	
		(6A-6B) 11,8	
Glycerin			
H-1A	3,76	(1A-2) ---	69,4
H-1B	3,44	(1B-2) 6,6	
		(1A-1B) 10,4	
H-2	3,99		68,1
H-3A	4,14	(3A-2) 4,7	65,4
H-3B	4,10	(3B-2) 5,9	
		(3A-3B) 11,4	

a. Vergleiche mit der Literatur. b austauschbar

**Tabelle 7.32:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Fettsäureester des Metaboliten GGL.5

	Chemische Verschiebung	Kopplungs- konstante	$^{13}\text{C}$ Chemische Verschiebung
Fettsäure ( $\text{CO}$ , $^2\text{CH}_2$ , $^3\text{CH}_2$ , $^{\text{rest}}\text{CH}_2\ldots$ )			
$\text{CO}$			174,9 174,6
$^2\text{CH}_2$	2,35		34,4
$^3\text{CH}_2$	1,63		25,2
$^{\text{rest}}\text{CH}_2$	1,3		
iso-Konfiguration [ $^{\text{a}}\text{CH}_3$ , $^{\text{b}}\text{CH}$ , $^{\text{c}}\text{CH}_2\ldots$ ]			
a	0,85	(a-b) 6,5	22,7
b	1,52		
c	1,16		39,3
anteiso-Konfiguration [ $^{\text{a}'}\text{CH}_3$ , $^{\text{b}'}\text{CH}_2$ , $^{\text{c}'}\text{CH}$ ( $^{\text{c}''}\text{CH}_3$ ), $^{\text{d}'}\text{CH}_2\ldots$ ]			
a', c''	0,86		11,5 19,3
b', c', d'	1,12, 1,26		

**Tabelle 7.33:** Massenspektrometrische Analyse der Lipidzusammensetzung mittels Negativ-Ionen ESI MS des Metaboliten GGL.5

Komponente	Negativ-Ion [M-H] <sup>-</sup> (%)	Fettsäure <sup>a</sup>	Anteil der Komponente
GGL5			
	863,6	C15:C15	9
	877,5	C15:C16	40
	891,6	C15:C17	51

<sup>a</sup> Iso:Anteiso 40:60



## Literaturverzeichnis

Acebal, C., Canedo, L.M., Puentes, J.L., Baz, J.P., Romero, F., de la Calle, F., Gravalos, M.D., Rodriguez, (P. 1999): Agrocholin, a new cytotoxic antibiotic from a marine *Agrobacterium*. Taxonomy, fermentation, isolation, physico – chemical properties and biological activity, *J. Antibiot* 52, 983 – 987

Althoff, K., Schütt, C., Steffen, R., Bartel, R., Müller, W. E. G. (1998): Evidence for a Symbiosis between Bacteria of the Genus *Rhodobacter* and the Marine Sponge *Halichondria panicea*: Harbor also for Putatively Toxic Bacteria?, *Mar. Biol.* 130, 1 - 7

Antranikian, G. (2004): Biokatalysatoren aus extremophilen Mikroorganismen – Neue Werkzeuge für Forschung Industrie und Umweltschutz, *Chemie Ingenieur Technik* 74

Baum, B., Siebers, D., Fleischer, L. G., Meyer, W. (2004): Eine Delfinhaut für Schiffe, *Biol. Unserer Zeit* 5, 298-305

Baumann, P., Gauthier, M.J., Baumann, L. (1984): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1, London: Williams & Wilkins Baltimore, 342 – 352

Benning, C., Huang, Z.-H., Gage, D. A. (1995): Accumulation of a Novel Glycolipid and a Betain Lipid in Cells of *Rhodobacter sphaeroides* Grown under Phosphat Limitation. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 103-111

Bertoldo, C., Dock, C., Antranikian, G. (2004): Thermoacidophilic Microorganisms and their Novel Biokatalyst, *Eng. Life Sci.* 6, 521-532

Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J. (1999): *Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, pp 177-182

Brundish, D. E., Baddiley, J. (1968): Synthesis of Glucosylglycerols and Diglucosylglycerol and their Identification in Small Amounts, *Carbohydr. Res.*, 8, 308

- Button, D., Hemmings, N. L. (1976): Lipoteichoic Acid from *Bacillus licheniformis* 6346 MH-1. Comparative Studies on the Lipid Proton of the Lipoteichoic Acid and the Membrane Glycolipid, *Biochemistry*, 15, 989
- Colombo, D., Franchini, L., Tomba, L., Ronchetti, F., Nakabe, N., Konoshima, T., Nishino, H., Tokuda, H. (2004): Anti-tumor-promoting activity of simple models of galactoglycerolipids with branched and unsaturated acyl chains, *European Journal of Medicinal Chemistry* 40, 69 – 74
- Colombo, C., Compostella, F., Ronchetti, F., Scala, A., Toma, L., Kushide, M., Tokuda, H., Nishino, H. (2000): Anti-tumor-promoting effects of glycolipid analogues on two-stage mouse skin carcinogenesis, *Cancer Letters* 616, 201 – 205
- Costantino, V., Fattorusso, E., Imperatore, C., Mangoni, A. (2002): Glycolipids from Sponges: Isolation and Structure Elucidation, 3rd European Conference on Marine Natural Products, Book of Abstracts, 44 – 45
- Cypionka, H. (2002): Grundlagen der Mikrobiologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2. Aufl., 217
- Dahlström, M., Jonsson, P. R., Lausmaa, J., Arnebrant, T., Sjögren, M., Holmberg, K., Mårtensson, L. G. E., Elwing, H. (2004): Impact of Polymer Surface Affinity of Novel Antifouling Agents, *Appl. Microbial. Biotechnol.* 86, 1-8
- DeLong, E. F. (1997): Marine Microbial Diversity: The Tip of the Iceberg, *Trends Biotechnol.* 15, 203 – 207
- De Vries, D. J., Hall, M. R. (1994): Marine Biodiversity as a Source of Chemical Diversity, *Drug Development Research* 33, 161 – 173
- Diel R., Seidler A., Nienhaus A., Rüscher-Gerdes S., Niemann S. (2005): Occupational risk of tuberculosis transmission in a low incidence area, Published online 2005 April 14. doi: 10.1186/1465-9921-6-35.

- Dolej, S. (1998): Wirkungen von Stoffwechselprodukten des Rhizobakteriums *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn im Pathosystem Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) - *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker, Dissertation an der Humboldt-Universität Berlin
- Falch, B. S., König, G. M., Sticher, O., Wright, A. D. (1995): Studies on the Glycolipid Content on the Canobacterium *Fischerella ambigua*, *Planta Med.*, 61, 540-543
- Fawcett, J. K., Scott, J. E. (1960): A Rapid and Precise Method for the Determination of Urea, *J. Clin. Path.* 13, 156 – 159
- Fawcett, J. K., Scott, J. E. (1960): A Rapid and Precise Method for the Determination of Urea, *J. Clin. Path.*, 13, 156
- Fenical, W. (2002): Assessing Marine Microbial Biodiversity for Drug Discovery (2002) 3rd European Conference on Marine Natural Products, Book of Abstracts, 18
- Fischer, W., Laine, A. R., Nakano, M. (1978): On the Relation between Glycerophosphoglycolipids and Lipoteichoic Acid in Gram-Positive Bacteria. I. The Occurrence of Phosphoglycolipids, *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 298
- Fisher, S.H. (1999): Regulation of Nitrogen Metabolism in *Bacillus subtilis* ATCC 21332 Using Potato Substrates, *Biosource Biotechnology* 75, 235 – 240
- Frautz, B., (1986): Bildung und Charakterisierung von Glycolipiden bei *Ustilago maydis* ATCC 14826 in Abhängigkeit vom Substrat. Dissertation an der TU Braunschweig
- Fukuda, Y., Sakai, K., Matsunaga, S., Tokuda, H., Tanaka, R. (2005): Cancer Chemopreventive Activity of Lupane- and Oleanane-Type Triterpenoids from Cones of *Liquidamber styraciflua*, *Chemistry and Biodiversity* Vol. 2, 421 – 427
- Gilmour, A., Allan, M.C., McCallum, M.F. (1975): The unsuitability of high pH media for the selection of marine *Vibrio* species, *Aquaculture* 7, 81 – 87

- Giudici, R., Pamboukian, C. R. D., Candida, M., Facciotti, R. (2003): Morphologically Structured Model for Antitumoral Retamycin Production During Batch and Fed – Batch Cultivations of *Streptomyces olindensis*, *Biotechnology and Bioengineering* 86, 415 – 424
- Göbbert, U., Schmeichel, A., Lang, S., Wagner, F. (1988): Microbial Transesterification of Sugar-Corynemycolates, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1519-1525
- Gueritte-Voegelein, F. (1986): Chemical Studies of 10-Deacetyl Baccatin III. Hemisynthesis of Taxol Derivatives, *Tetrahedron Letters* **42**, 4451
- Haas, M. J., Cichowicz, D. J., Phillips, J., Moreau, R. (1993): The Hydrolysis of Phosphatidylcholine by an Immobilized Lipases: Optimization of Hydrolysis in Organic Solvents, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 111-117
- Halvorsen, H.O., Keynan, A., Kornberg, H.L. (1990): Utilisation of calcium phosphates for microbial growth at alkaline pH, *Soil Biology and Biochemistry* 22, 887 – 890
- Hausmann, R. (2003): Produktion von Schwammbiomasse ex-situ? Bioverfahrenstechnische Ansätze, Abstractbok BioRegion
- Hejazi, M. A., Andrysiewics, E., Tramper, J., Wijffels, R. H. (2003): Effect of Mixing Rate on  $\beta$ -Carotene Production and Extraction by *Dunaliella Salina* in Two-Phase Bioreaktor, *Biotechnol. and Bioeng.* 5, 591-596
- Hentzer, M., Givskov, M. (2003): Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections, *J Clin Invest.*, 112(9): 1300–1307
- Henzler, H. J. (1982): Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter, *Chem. Ing. Tech.* 5, 461-476

Hibino, W., Kadotani, Y., Kominami, M., Yamane, T. (1993): Three Automated Feeling Strategies of Natural Complex Nutrients Utilizing On-Line Turbidity Values in Fed-Batch Culture: A Case Study on the Cultivation of marine Microorganism, J. Ferment. Bioengin. 75, 443 – 450

Hochlowski, J.E., Jackson, M., Rasmussen, R.R., Buko, A.M., Clement, J.J., Whittern, D.N., McAlpine, J.B. (1997): Produktion of brominated tiacumicin derivatives, J. Antibiot. Tokyo 50, 201-205

Hommel, R. K., Radledge, C. (1993): Biosynthetische Mechanismen von Low Molekular Weight Surfactants und Their Precursor Molecules., In: Biosurfactants, Production, Properties, Applications. Ed. Kosaric N, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong pp 4-63

Hünners, M. (1999): Naturstoffscreening und Bioprozeßoptimierung der Wirkstoffproduktion eines marinen schwammassoziierten Bakteriums, Dissertation an der TU Braunschweig

Inada, Y. (1996): Manufacture of Glycerophosphorylcholine from Phosphatidylcholine with modified Lipase, Japanese Patent, JP 63105685 A2 880510

Ito, C. M., Itoigawa, M., Ju-ichi, N., Sakamoto, H., Nishino, H., Tokuda, H., Furukawa (2005): Antitumor-Promoting Activity of Coumarins from *Citrus* Plants, Planta Med 71, 84 – 87

Izumida, H., Adachi, K., Mihara, A., Yasuzuwa, T., Sano, H. (1997): Hydroxyakalone, a novel xanthine oxidase inhibitor produced by a marine bacterium, *Agrobacterium auratiacum*, J. Antibiot 50, 916 – 918

Judat, H. (1998): Zum dispergieren von Gasen, Dissertation Universität Dortmund

Jui-Sheng, S., Yang-Hwei, T., Hwa-Chang, L., Yi-Shiong, H., Feng-Huei, L. (1996): The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts, J Biomed Mater Res 37, 324-334

Kates, M. (1990): Handbook of Lipid Research. 6. Glycolipids, Phosphoglycolipids and Sulfoglycolipids of Bacteria, 1. Auflage, Plenum Press, New York

Komaratat, P., Kates, M. (1975): The Lipids of a Halotolerant Species of *Staphylococcus epidermis*, *Biochim. Biophys. Acta*, 398, 464

König, G. M., Wirth, A. D. (1997): Meeresorganismen – Produzenten pharmakologisch aktiver Sekundärstoffe, *Pharmazie in unserer Zeit* 6, 281-287

Landy, M., Warren, G.H., Roseman, S.P., Collo, L.G. (1948): Bacilliomycin: An Antibiotic from *Bacillus subtilis* Active Against Pathogenic Fungi, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67, 539 – 541

Lang, D. R., Lundgren D. G. (1970): Lipid Components of *Bacillus cereus* during Growth and Sporulation, *J. Bacteriol.*, 101, 483

Lang, S., Trowitsch-Kienast, W. (2002): Biotenside, Teubener Verlag

Langer, O. (2004): Optimierung der mikrobiellen Produktion und enzymatische Modifizierung von Glycolipiden aus *Tsukamurella spec. nov.*, Dissertation an der TU Braunschweig

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (2001): Biochemie, Springer Verlag Berlin

Lesney, M. S. (2004): Natural products from plants remain at the core of modern medicinal chemistry, *Today at work*, 26 – 32

Lindel, T. (1998): Marine Naturstoffe am Great Barrier Reef, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 12, 1175-1177

Lokotsch, W. (1994): Biokatalytische Synthese und physiko-chemische Charakterisierung von ungewöhnlichen Wachsesteren, Dissertation an der TU Braunschweig

Lowry, O. H., Rosebrouth, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein Measurment with the Folin Phenol Reagenz, J. Biol. Chem. 193, 265 – 275

Lurtz, V., Lang, S. (2004): Einfluss von komplexen Medienbestandteilen auf Kultivierung und Produktbildung eines marinen Bakteriums, Tagungshandbuch der 22. Jahrestagung der Biotechnologen 2004, 510

MacLeod, R. A., Wisse, G. A., Stejskal F. L. (1988): Sensitivity of some marine bacteria, a moderate halophile, and Escherichia coli to uncouplers at alkaline pH., J Bacteriol. 170, 4330 – 4337

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2000): Brock biology of microorganisms, Pentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey 07458, 104-105

Mancini, I., Guella, G., Defant, A., Candenas, M. L., Armesto, C. P., Depenori, D., Pietra, F. (1998): Polar Metabolites of the Tropical Green Seaweed Caulerpa taxofolia Wich is Spreading in the Mediterranean Sea: Glycoglycerolipids and stable Enols ( $\alpha$ -Keto Esters), Helv. Chim. Acta, 81, 1681-1691

Matsufuji, M., Taguchi, K., Inagaki, M., Higuchi, R., Otha, S., Yoshimoto, A (2000): Glycoglycerolipids Preventing tert-Butylhydroperoxide-Induced Cell Death from Microbacterium spec. and Corynebacterium aquaticum strains, J. Biosci. Bioeng., 89, 170-175

Mendoza, C. R., Jimenez, I. A., Tokuda, H., Kushida, H., Bazzocchi, I. L. (2005): Antitumor-Promoting Effects of New Sesquiterpenes from *Crossopetalum tonduzii*, Chemstry and Biodiversity Vol. 2, 286 – 294

Mohapatra, B. R., Bapuji, M., Sree, A. (2003): Produktion of Industrial Enzymes (Amylase, Carboxymethylcellulase and Protease) by Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms, Acta Biotechnol. 23, 75-84

Mounfort, D.O., Pybus, V. (1992): Effect of pH, temperature and salinity on the production of gamma aminobutyric acid (GABA) from amines by marine bacteria, FEMS Microbiology Letters 101, 237 – 244

Mukherjee, A., Raichur, A. M., Modak, J. M., Natarajan, K. A. (2004): Exploring process options to enhance metal dissolution in bioleaching of Indian Ocean nodules, Journal of Chemical Technol. and Biotechnol. 79, 512-517

Murakami, A., Nakamura, Y., Koshimizu, K., Ohigashi, H. (1995): Glycoglycerolipids from Citrus hystrix, a traditional Herb in Thailand, Potently Inhibit the Tumor-Promoting Activity of 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate, J. Agric. Food Chem., 43, 2779-2783

Murakami, N., Morimoto, T., Imamura, H., Ueda, T., Nagai, S., Sakakibara, J., Yamada, N. (1991): Studies on Glycolipids: III. Glycoglycerolipids from an Axenically Cultured Cyanobacterium Phormidium tenue, Chem. Pharm. Bull., 39, 2277-2281

Murphy, J., Riley, J. (1962): A modified single solution for the determination of phosphate in natural waters, Anal. Chim. 27, 31 – 36

Mutzall, K. (1994): Mikrobielle Reaktionen. In: Modellierung von Bioprozessen, Behr's Verlag GmbH, 248 – 250

Nagaoka, Y., Kumagai, A., Tokuda, H., Nishino, H., Hara, Y., Uesato, S. (2005): Tumor Chemopreventive Effect of Orally Administered (-)-Epigallocatechin and Its 3-O-Acylated Derivates on the Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis Induced by Peroxynitrite and 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, Natural Medicines 59, 49 – 51

Nävecke, R., Tepper, K. P. (1986): Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden, G. Fischer Verlag, Stuttgart



- Niepel, T., Meyer, H., Wray, V., Abraham, W. R. (1997): A New Type of Glycolipid, 1-[ $\alpha$ - Mannopyranosyl-(1 $\alpha$ -3)-(6-O-acyl- $\alpha$ -mannosyl)]-3-O-acylglycerol, from *Arthrobacter atrocyaneus*, Tetrahedr., 53, 3593-3602
- Oyama, Y., Endoh, K. (1955): Power characteristics of gas-liquid contacting mixers, Chem. Engng. (Japan) 19, 2-11
- Parsek, M.R., Fuqua, C. (2004): Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life., J Bacteriol., 186(14): 4427-4440.
- Passerie, A., Schmidt, M., Haffner, T., Wray, V., Lang, S., Wagner, F. (1992): Marine Biosurfactants IV. Production, Characterization and Biosynthesis of an Anionic Glucose Lipid from the Marine Bacterial Strain MM1, Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 281-286
- Proksch, P., Schupp, P. (1996): Chemische Ökologie Mariner Invertebraten, BIOforum 1-2, 22-25
- Rama, P., Tripathi, Neetu Tewari, Namrata Dwivedi, Tiwari, Vinod K. (2004): Fighting tuberculosis: An old disease with new challenges, Medical Research Reviews
- Ramm, W. (2001): Bildung und Charakterisierung biologisch und physiko-chemisch aktiver Metabolite aus den marinen schwamm-assoziierten Bakterien *Psychroflexus* spec. nov. und *Bacillus subtilis*, Dissertation an der TU Braunschweig
- Ramm, W., Schatton, W., Wagner-Döbler, I., Wray, V., Nimtz, M., Tokuda, H., Enjo, F., Nishino, H., Beil, W., Heckmann, R., Lurtz, V., Lang, S. (2003): Diglucosyl-glycerolipids from the marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: their production, enzymatic modification and properties, Appl. Microbiol. Biotechnol.
- Rehm, H., Hammer, F. (2001): Biochemie light, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main

Riedel, R. (1983): Fauna und Flora des Mittelmeeres, Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin

Risse, J.M., Flaschel, E. (2004): Kultivierung von Mikroorganismen durch Sauerstoffversorgung mittels Wasserstoffperoxid, Programm/ Kurzfassung der Beiträge DECHEMA/GVC „Simultane und integrierte Bioprozeßentwicklung“ 2004, 28

Regitz, J. u. M. (1992): RÖMPP Chemielexikon. 6 Bände. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Sakurai, N., Kozuka, M., Tokuda, H., Mukainaka, T., Enjo, F., Nishino, H., Nagai, M., Sakurai, Y., Lee, K. (2005): Cancer preventive agents. Part 1: Chemopreventive potential of cimigenol, cimigenil-3,15-dione, and related compounds, Bioorganic and Medicinal Chemistry 13, 1403 – 1408

Schlegel, H. G. (1992): Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 7. überarbeitete Auflage, 532

Sokoll, A. (1999): Untersuchung der Initiation der Surfactin-Biosynthese in *Bacillus subtilis* OKB 105, Dissertation TU Berlin

Stryer, L. (1995): Biochemie, 4th edn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 1995

Takada, Y., Fukunaga, N., Sasaki, S. (1991): Na<sup>+</sup> - driven ATP synthesis of a psychrophilic marine bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE – 1, FEMS Microbiology Letters 82, 225 – 228

Tanaka, R., Kinouchi, Y., Wada, S., Tokuda, H. (2005): Potential Anti-Tumor Promoting Activity of Lupane-Type Triterpenoids from the Stem Bark of *Glochidion zeylanicum* and *Phyllanthus flrxuosus*, Planta Med 70, 1234 – 1236

Terlau, H., Bach, G., Zeek, A. (2000): Das medizinische Potential von Naturstoffen, Der Gynäkologe 33, 6-10

Tripathi, R.P., Tewari, N., Dwivedi, N., Tiwari, V.K. (2005): Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges, *Med Res Rev.* 25(1), 93-131.

Vollbrecht, E. (1999): Mikrobielle Produktion von Oligosacharidlipiden auf der Basis pflanzlicher Öle durch *Tsukamurella* spec. nov.. Dissertation an der TU Braunschweig

Ward, O.P. (1994): Bioreaktionen Prinzipien, Verfahren, Produkte, Berlin – Heidelberg, Springer Verlag

Wartenberg, A. (1989): Einführung in die Biotechnologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Wicke, C. (1999): Produktion und Charakterisierung von biologisch und physikochemisch wirksamen Metaboliten aus dem marinen schwammassizierten *Microbacterium* spec. nov. DSM 12583, Dissertation an der TU Braunschweig

Wicke, C., Hüners, M., Wray, V., Nimtz, M., Bilitewski, U., Lang, S. (2000): Production and structure elucidation of glycoglycerolipids from a marine sponge-associated *Microbacterium* spec. nov. *J. Nat. Prod.*, 63, 621-626.

Zangirolami, T.C., Johansen, C.L., Nielsen, J., Jorgenson, S.B. (1996): Simulation of Penicillin Production in Fed – Batch Cultivations Using a Morphologically Structured Model, *Biotechnology and Bioengineering* 56, 593 – 604

Zeek, A., Bach, G. (1999): Initiativen zur marinen Naturstoffforschung in Deutschland, *Deutsche Hydrographische Zeitschrift* 10, 91-95

Zlokarnik, M. (1973): Rührleistung in begasten Flüssigkeiten, *Chem.-Ing. Tech.* 45, 689 – 692

Zlokarnik, M. (2000): Scale-up: Modellübertragung in der Verfahrenstechnik, Wiley-VCH Weinheim

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Verena Böschen, geb. Lurtz  
Geburtsdatum, -ort: 21. September 1971, Gardelegen  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Verheiratet

## Schulbildung:

1978 – 1988 Polytechnische Oberschule, Kalbe/Milde  
1988 – 1990 Berufsbildende Schule, Potsdam  
1991 Technische Hochschule Köthen, Abitur

## Berufsausbildung:

1988 – 1990 Lebensmittel Chemie Laborantin, Ausbildungsbetrieb:  
LPG Kalbe/Milde

## Studium:

1991 – 1993 Studium der Biotechnologie/Lebensmitteltechnik,  
Technische Hochschule Köthen  
1993 Vordiplom  
1993 – 1999 Studium des Maschinenbaus, Technische Universität  
Braunschweig  
1999 Diplom

## Promotion:

2000 – 2005 Wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Biochemie und  
Biotechnologie, Technische Universität Braunschweig,  
Anfertigung der Dissertation

## Berufstätigkeit:

Okt. 2005 – Juli 2006 Wissenschaftliche Tätigkeit am Internationalen  
Forschungsinstitut für Futtermittel IFF, Braunschweig